



Universität Hamburg

DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG



DISSERTATION

Entwicklung von LC-MS/MS-basierten Assays zur Quantifizierung und Charakterisierung der Adsorption von Analyten an Oberflächen

zur Erlangung des Grades

*Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)*

Vorgelegt von:

Bente Katharina Siebels

Universität Hamburg
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Chemie

An der Universität Hamburg eingereichte Dissertation

Hamburg, Oktober 2025

Gutachter:

1. Gutachter: Prof. Dr. Hartmut Schlüter
2. Gutachter: PD Dr. habil. Markus Perbandt
3. Gutachter: Prof. Dr. Robert Ahrends

Prüfungskommission:

1. Vorsitzender: Prof. Dr. Hartmut Schlüter
2. Stellv. Vorsitzender: Prof. Dr. Ralph Holl
3. Dr. Thomas Hackl

Datum der Disputation:

19.12.2025

Druckfreigabe:

09.01.2026

Diese Dissertation wurde im Zeitraum von April 2022 bis Oktober 2025 in der Sektion für Massenspektrometrie und Proteomanalytik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Publikationsliste

Publikationen

2025

OmixLitMiner 2: Guided Literature Mining Tools for Automated Categorization of Marker Candidates in Omics Studies.

Gocke A*, **Siebels B***, Navolić J, Reinbold C, Neumann J E, Kurtz S, Schlüter H. Proteomics. 2025 Dec;25(23):46-52. doi: 10.1002/pmic.70070. *Autorinnen trugen gleichberechtigt bei.

G-CSF/NAMPT signaling drives neutrophil dysfunction and enhances bacterial infection susceptibility in cancer patients.

Pylaeva E, Tollrian L, Riedesel J, Shevchuk O, Thiel I, Öznel I, Kabankova N, Voß H, **Siebels B**, Schlüter H, Haist C, Hanenberg H, Mattheis S, Kürten C, Sperandio M, Kehrmann J, Engel DR, Lang S, Jablonska J. Nat Commun. 2025 Dec 12;16(1):11137. doi: 10.1038/s41467-025-67471-4.

Fructose uptake by brown adipose tissue is independent of carbohydrate response element-binding protein and does not cause elevated de novo lipogenesis.

Behrens J, Fuh MM, Haas DT, Jaeckstein MY, Heine M, **Siebels B**, Worthmann A, Krahmer N, Heeren J, Scheja L. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2025 Dec 18. doi: 10.3724/abbs.2025229.

High Rate Triggers Increased Atrial Release of BMP10, A Biomarker for Atrial Fibrillation and Stroke, and BMP10 Affects Ventricular Cardiomyocytes.

Sommerfeld L C, Schrapers J, Müller K-F, Bravo L, **Siebels B**, Vermeer-Stoter A M S, Pan B, Höppner G, O'Shea C, Ridder J, Wieboldt H, Sander P, Zeller T, Chua W, Purmah Y J V, Gardner R S, Tucker N R, Kirchhof P, Hirt M N, Eschenhagen T, Stenzig J, Fabritz L. Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology 0(0):e013834. doi: 10.1161/CIRCEP.125.013834.

CDKL1 variants affecting ciliary formation predispose to thoracic aortic aneurysm and dissection.

Nauth T, Philipp M, Renner S, Burkhalter MD, Schüler H, Saygi C, Händler K, **Siebels B**, Busch A, Mair T, Rickassel V, Deden S, Hoffer K, Olfe J, Mir TS, von Kodolitsch Y, Girdauskas E, Rybczynski M, Kriegs M, Voß H, Sauvigny T, Spielmann M, Alawi M, Krasemann S, Kubisch C, Demal TJ, Rosenberger G. J Clin Invest. 2025 Oct 7:e186287. doi: 10.1172/JCI186287.

Extracellular Vesicles Released From Cortical Neurons Influence Spontaneous Activity of Recipient Neurons.

Lombino FL, Shafiq M, Matamoros-Angles A, Schwarz JR, Gromova KV, Stajano D, **Siebels B**, Bergmann L, Magnus T, Schweizer M, Ricklefs FL, Schlüter H, Hill AF, Kneussel M, Glatzel M. J Neurochem. 2025 Sep;169(9):e70231. doi: 10.1111/jnc.70231.

Red blood cell-tumor cell interactions promote tumor cell progression.

Pereira-Veiga T, Yáñez-Gómez C, Pekkarinen A, Abuín C, Blechner C, González-Conde M, Mess C, Vidal-Y-Sy S, Moustafa A, **Siebels B**, Dávila-Ibáñez AB, Cabezas-Sainz P, Santos M, Sánchez L, Gorgulho J, Götze J, Meißner K, Cueva J, Palacios P, Cortegoso A, Curiel T, Rodríguez C, Carmona M, León-Mateos L, Abalo A, Muñelos-Romay L, Peine S, Schmidt M,

Heuer-Olewinski N, Reck M, Abdo M, Lamszus K, Bauer AT, López-López R, Pantel K, Windhorst S, Wikman H, Costa C. *J Exp Clin Cancer Res.* 2025 Apr 29;44(1):134. doi: 10.1186/s13046-025-03376-w.

A reference database enabling in-depth proteome and PTM analysis of mouse immune cells. Siemes D, Voss H, Benvenuti F, Simoncello F, Kopczynski D, **Siebels B**, Schlüter H, Kollipara L, Sickmann A, Engel DR, Shevchuk O. *Sci Data.* 2025 Apr 10;12(1):596. doi: 10.1038/s41597-025-04829-9.

Targeting the AKT/mTOR pathway attenuates the metastatic potential of colorectal carcinoma circulating tumor cells in a murine xenotransplantation model.

Smit DJ, Pereira-Veiga T, Brauer H, Horn M, Nissen P, Mair T, **Siebels B**, Voß H, Zhuang R, Haider MT, Loreth D, Iskhakova M, Lindemann B, Kött J, Cayrefourcq L, Wellbrock J, Schlüter H, Pantel K, Alix-Panabières C, Jücker M. *Mol Oncol.* 2025 Mar 25. doi: 10.1002/1878-0261.70024

Functional Role of Fatty Acid Synthase for Signal Transduction in Core-Binding Factor Acute Myeloid Leukemia with an Activating c-Kit Mutation.

Zhuang R, **Siebels B**, Hoffer K, Worthmann A, Horn S, von Bubnoff NCC, Khandanpour C, Gebauer N, Gorantla SP, Voss H, Schlüter H, Kriegs M, Fiedler W, Bokemeyer C, Jücker M, Kebenko M. *Biomedicines.* 2025 Mar 3;13(3):619. doi: 10.3390/biomedicines13030619.

Inhibition of tumour necrosis factor alpha by Etanercept attenuates Shiga toxin-induced brain pathology.

Christ R, Siemes D, Zhao S, Widera L, Spangenberg P, Lill J, Thiebes S, Bottek J, Borgards L, Pinho AG, Silva NA, Monteiro S, Jorch SK, Gunzer M, **Siebels B**, Voss H, Schlüter H, Shevchuk O, Chen J, Engel DR. *J Neuroinflammation.* 2025 Feb 7;22(1):33. doi: 10.1186/s12974-025-03356-z.

2024

Assay for Characterizing Adsorption-Properties of Surfaces (APS).

Siebels B, Moritz M, Hübler D, Gocke A, Riedner M, Voß H, Schlüter H. *Chemistry.* 2024 Dec 5;30(68):e202403000. doi: 10.1002/chem.202403000

Efficient enzyme-free isolation of brain-derived extracellular vesicles.

Matamoros-Angles A, Karadjuzovic E, Mohammadi B, Song F, Brenna S, Meister SC, **Siebels B**, Voß H, Seuring C, Ferrer I, Schlüter H, Kneussel M, Altmeppen HC, Schweizer M, Puig B, Shafiq M, Glatzel M. *J Extracell Vesicles.* 2024 Nov;13(11):e70011. doi: 10.1002/jev2.70011.

Chronic Activation of Tubulin Tyrosination Improves Heart Function.

Pietsch N, Chen CY, Kupsch S, Bacmeister L, Geertz B, Herrera-Rivero M, **Siebels B**, Voß H, Krämer E, Braren I, Westermann D, Schlüter H, Mearini G, Schlossarek S, van der Velden J, Caporizzo MA, Lindner D, Prosser BL, Carrier L. *Circ Res.* 2024 Oct 11;135(9):910-932. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.124.324387.

Hypoxia-Induced Adaptations of N-Glycomes and Proteomes in Breast Cancer Cells and Their Secreted Extracellular Vesicles.

Peng B, Bartkowiak K, Song F, Nissen P, Schlüter H, **Siebels B**. *Int J Mol Sci.* 2024 Sep 23;25(18):10216. doi: 10.3390/ijms251810216.

Multiomic profiling of medulloblastoma reveals subtype-specific targetable alterations at the proteome and N-glycan level.

Godbole S, Voß H, Gocke A, Schlumbohm S, Schumann Y, Peng B, Mynarek M, Rutkowski S, Dottermusch M, Dorostkar MM, Korshunov A, Mair T, Pfister SM, Kwiatkowski M, Hotze M, Neumann P, Hartmann C, Weis J, Liesche-Starnecker F, Guan Y, Moritz M, **Siebels B**, Struve N, Schlüter H, Schüller U, Krisp C, Neumann JE. Nat Commun. 2024 Jul 24;15(1):6237. doi: 10.1038/s41467-024-50554-z.

Cystatin C loaded in brain-derived extracellular vesicles rescues synapses after ischemic insult in vitro and in vivo.

Gui Y, Kim Y, Brenna S, Wilmes M, Zagheni G, Goulbourne CN, Kuchenbecker-Pöls L, **Siebels B**, Voß H, Gocke A, Schlüter H, Schweizer M, Altmeppen HC, Magnus T, Levy E, Puig B. Cell Mol Life Sci. 2024 May 20;81(1):224. doi: 10.1007/s00018-024-05266-4.

HERC5 downregulation in non-small cell lung cancer is associated with altered energy metabolism and metastasis.

Schneegans S, Löptien J, Mojzisch A, Loreth D, Kretz O, Raschdorf C, Hanssen A, Gocke A, **Siebels B**, Gunasekaran K, Ding Y, Oliveira-Ferrer L, Brylka L, Schinke T, Schlüter H, Paatero I, Voß H, Werner S, Pantel K, Wikman H. J Exp Clin Cancer Res. 2024 Apr 11;43(1):110. doi: 10.1186/s13046-024-03020-z.

Extracellular proteins enhance Cupriavidus pauculus nickel tolerance and cell aggregate formation.

Wang M, Vollstedt C, **Siebels B**, Yu H, Wu X, Shen L, Li J, Liu Y, Yu R, Streit WR, Zeng W. Bioresour Technol. 2024 Feb; 393:130133. doi: 10.1016/j.biortech.2023.130133.

Application of sample displacement batch chromatography for fractionation of proteoforms. Hidayah SN, Biabani A, Gaikwad M, Nissen P, Voß H, Riedner M, Schlüter H, **Siebels B**. Proteomics. 2024 Feb;24(3-4):e2200424. doi: 10.1002/pmic.202200424.

2023

Proteome Analysis of Thyroid Hormone Transporter Mct8/Oatp1c1-Deficient Mice Reveals Novel Dysregulated Target Molecules Involved in Locomotor Function.

Siemes D, Vancamp P, Markova B, Spangenberg P, Shevchuk O, **Siebels B**, Schlüter H, Mayerl S, Heuer H, Engel DR. Cells. 2023 Oct 19;12(20):2487. doi: 10.3390/cells12202487.

2021

Investigation of the Proteomes of the Truffles *Tuber albidum pico*, *T. aestivum*, *T. indicum*, *T. magnatum*, and *T. melanosporum*.

Krösser D, Dreyer B, **Siebels B**, Voß H, Krisp C, Schlüter H. Int J Mol Sci. 2021 Nov 30;22(23):12999. doi: 10.3390/ijms222312999.

Co-activation of Sonic hedgehog and Wnt signaling in murine retinal precursor cells drives ocular lesions with features of intraocular medulloepithelioma.

Dottermusch M, Sumislawski P, Krevet J, Middelkamp M, Voß H, **Siebels B**, Bartsch H, Sotlar K, Meyer P, Frank S, Korshunov A, Glatzel M, Schüller U, Neumann JE. Oncogenesis. 2021 Nov 16;10(11):78. doi: 10.1038/s41389-021-00369-0.

Wissenschaftliche Vorträge

Vortrag: Mass Spectrometry of Intact Proteins and Fragmentation Techniques

Short Course, 3rd International Top-Down Proteomics Symposium 2025, Hamburg, Deutschland

Vortrag: OmixLitMiner 2: Guided Literature Mining Tool for Efficient Classification and Validation of Omics Studies

Sino-German-Mobility-Programm 2025, Shanghai, China

Vortrag: Spatially resolved mass spectrometric proteomics of infected murine bladders

Sino-German-Mobility-Programm 2024, Hamburg, Deutschland

Poster: Thoracic Aortic Diseases: Identification of Diagnostic Biomarkers Using Bottom-Up

Proteome Analysis of Extracellular Vesicles and PRM of Plasma Samples

GSEV Autumn Meeting 2024, Hamburg, Deutschland

Vortrag: Assay for characterizing adsorption properties of surfaces (APS)

APMRS-CCEPS 2024, Wien, Österreich – Best Presentation Award

Vortrag: Spatially resolved mass spectrometric proteomics analysis facilitated by infrared laser-based sampling of infected murine bladders

IMSC 2024, Melbourne, Australien

Vortrag: Top-down mass spectrometry for the analysis of proteoforms

Sino-German-Mobility-Programm 2024, Shanghai, China

Vortrag: High Resolution Mass Spectrometry from Large Molecules

Fachgruppe FTMS, DGMS 2024, Freising, Deutschland

Poster: Assay for analysing adsorption properties of surfaces (APS) uncovers loss of molecules during sample handling for LC-MS/MS

DGMS 2024, Freising, Deutschland

Vortrag: Influence of consumables quality on analyte adsorption to surfaces - Assay for characterizing adsorption properties of surfaces (APS)

Eppendorf Lunch-Seminar, DGMS 2024, Freising, Deutschland

Vortrag/Poster: Needs for and challenges in the analysis of proteoforms

Beilstein Enzymology Symposium 2023, Rüdesheim, Deutschland

Vortrag: System for investigating adsorption properties of surfaces of sample preparation devices

Sino-German-Mobility-Programm 2023, Shanghai, China

Poster: Mass spectrometry-based proteome analysis of inflamed murine and human samples for the identification of biomarkers and novel targets to treat urinary tract infections

IMSC 2022, Maastricht, Niederlande

Inhaltsverzeichnis

Publikationsliste	4
Abkürzungsverzeichnis	11
Abbildungsverzeichnis	13
Tabellenverzeichnis	15
1. Zusammenfassung.....	16
2. Abstract	18
3. Einleitung.....	20
3.1. Relevanz von Adsorptionsprozessen in der analytischen Chemie	20
3.2. Grundlagen der Adsorption an Oberflächen	21
3.2.1. Definition und relevante Modelle	21
3.2.2. Einflussfaktoren auf die Adsorption von Analyten an Oberflächen.....	22
3.3. Beispiele ungewollter Adsorption aus Analytik, Pharmazie und Medizin	23
3.4. Adsorption in der Bottom-up-Proteomik	24
3.4.1. Analytischer Workflow der LC-MS-basierten Bottom-up-Proteomik	24
3.4.2. Charakteristika tryptischer Peptide.....	27
3.4.3. Datenanalyse und Quantifizierung	29
3.4.4. Ursachen von Peptid-Adsorption	31
3.5. Methoden zur Charakterisierung von Oberflächen und deren Adsorptionsverhalten.....	32
3.5.1. Charakterisierung von Oberflächen.....	32
3.5.2. Modellierung und Vorhersage von Adsorption	33
3.5.3. Fluoreszenz-basierte Analyse von Adsorption	34
3.5.4. LC-MS-basierte Methoden zur Analyse von Adsorption.....	35
4. Problemstellung und Ziel der Arbeit	36
5. Material und Methoden.....	38
5.1. Material	38
5.1.1. Getestete Gefäße	38
5.1.2. Peptide und Chemikalien.....	40
5.1.3. Geräte und Chromatographiesäulen	41
5.1.4. Software	42
5.2. Probenvorbereitung, Messung und Analyse zur Entwicklung des APS-Assays ..	43
5.2.1. Bestimmung der benetzten Oberfläche	43
5.2.2. Probenvorbereitung	43
5.2.3. LC-MS/MS-Analyse	43
5.2.4. Datenbanksuche.....	44
5.2.5. Statistische Analyse und Visualisierungen	45
5.2.6. Analyse der physikochemischen Eigenschaften adsorbiertter Peptide	46
5.3. Automatisiertes Python Skript (APS-Assay-Skript)	46

5.4.	Testung von 96-Well-Platten von Hersteller A	47
5.5.	Testung von 1,5-mL-Gefäßen von Hersteller A aus m-PP-Platte	48
5.6.	Proteinquantifizierung und Analyse.....	49
5.7.	LC-Tandem-Quadrupol-MS-Messungen von synthetischen Peptiden	50
5.7.1.	Herstellung der Peptidstammlösungen.....	50
5.7.2.	Vorbereitung der Proben zur Adsorptionsbestimmung.....	50
5.7.3.	Probenvorbereitung zum Vergleich mit FITC-markierten Peptiden	50
5.7.4.	Probenvorbereitung für synthetische Peptid-Kinetik.....	51
5.7.5.	MRM-Messungen zur Quantifizierung	51
5.8.	Bestimmung der Peptidsekundärstruktur.....	53
5.8.1.	Strukturvorhersage mit AlphaFold 3	53
5.8.2.	Zirkulardichroismus-Spektroskopie	53
5.9.	Einsatz KI-gestützter Tools	55
5.10.	Datenbereitstellung	55
6.	Ergebnisse	56
6.1.	Entwicklung des APS-Assays	56
6.1.1.	Überprüfung der benetzten Fläche.....	56
6.1.2.	Analytenwahl	57
6.1.3.	Entwicklung des Versuchsaufbau.....	57
6.1.4.	Datenkuration	59
6.1.5.	Quantifizierung adsorbiertter Peptide	65
6.1.6.	Vergleich adsorbiertter Peptide	67
6.1.7.	Nicht-detektierbare Peptide nach Inkubation.....	69
6.1.8.	Untersuchung der Eigenschaften adsorbiertter Peptide.....	70
6.2.	Optimierung des APS-Assays.....	76
6.2.1.	Das APS-Assay-Skript – Automatisierte Datenauswertepipeline	76
6.2.2.	Testung von Autosampler-geeigneten Gefäßen.....	77
6.2.3.	Anwendung des optimierten APS-Assays	79
6.3.	Auswirkung der Peptidadsorption auf Proteomik-Projekte	82
6.3.1.	Einfluss der Peptid-Adsorption auf die Proteinabundanzen	82
6.3.2.	Einfluss der Adsorption auf Gene-Set-Enrichment-Analysen.....	85
6.4.	Entwicklung des Tandem-Quadrupol-MS-basierten Fast-Assays.....	89
6.4.1.	Auswahl geeigneter Peptide	89
6.4.2.	Entwicklung einer Tandem-Quadrupol-basierten MS-Methode.....	89
6.4.3.	Kinetik zur Bestimmung des Adsorptionsverhaltens über die Zeit	91
6.4.4.	Fast-Assay zur schnellen Messung hydrophober Wechselwirkungen	92
6.4.5.	Auswirkung des Labels Fluorescein-Isothiocyanat auf Adsorptionsassays.....	95
6.5.	Einfluss der Peptidsekundärstruktur auf das Adsorptionsverhalten.....	97
6.5.1.	Verteilung hydrophober Aminosäuren	97
6.5.2.	Sekundärstrukturvorhersage mittels AlphaFold 3.....	99

6.5.3.	Sekundärstrukturbestimmung mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie	100
6.5.4.	Überprüfung einer Peptidaggregation	106
6.5.5.	Anpassung des APS-Assay-Skripts	107
7.	Diskussion	109
8.	Ausblick	121
9.	Literaturliste	123
10.	Anhang	136
10.1.	Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS	136
10.2.	APS-Assay: Python-basiertes Skript	137
10.3.	Ergänzende Abbildungen	145
10.4.	Ergänzende Tabellen	148
11.	Danksagung	155
12.	Eidesstattliche Versicherung	157

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Begriff
ACN	Acetonitril
AES	Auger-Elektronenspektroskopie
APS	Adsorption Properties of Surfaces
AUC	Fläche unter der Kurve (Area Under the Curve)
BET	Brunauer–Emmett–Teller(-Isotherm)
BSA	Bovines Serumalbumin
C18	Octadecylgruppe
CD	Zirkulardichroismus (engl. Circular Dichroism)
CID	Kollisionsdissoziation (engl. Collision-Induced Dissociation)
DDA	engl. Data-Dependent Acquisition
DDM	n-Dodecyl- β -D-maltosid
DIA	engl. Data-Independent Acquisition
DPBS	Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung
ESI	Elektrospray-Ionisation
ETD	Elektronentransferdissoziation
FA	Ameisensäure
FDR	Falsch-Positiv-Rate (engl. False Discovery Rate)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FT-ICR	Fourier-Transform-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie
G	Glas
GC	Gaschromatographie
GRAVY	engl. Grand Average of Hydropathy
GSEA	Gene-Set-Enrichment-Analyse
HCD	Kollisionsdissoziation höherer Energie (engl. Higher-Energy Collisional Dissociation)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. High-Performance Liquid Chromatography)
HSP	Hot-Spot-Bereich (engl. Hot Spot Area)
iTRAQ	engl. Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation
LC	Flüssigchromatographie (engl. Liquid Chromatography)
LC-MS	Flüssigchromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie-gekoppelte Tandem-Massenspektrometrie
LDPE	engl. Low Density Polyethylen

LFQ	Label-freie Quantifizierung (engl. Label-free Quantification)
m-G	modifiziertes Glas
m-PP	modifiziertes Polypropylen
MAR	engl. Missing at Random
MLP	Molekulares Lipophilizitäts-Potential (engl. Molecular Lipophilicity Potential)
MRM	Multiple Reaction Monitoring
NMAR	engl. Not Missing at Random
NMR	Kernspinresonanz (engl. Nuclear Magnetic Resonance)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (engl. Principal Component Analysis)
pLDDT	Predicted Local Distance Difference Test (Qualitätswert der AlphaFold-Vorhersage)
PP	Polypropylen
PRM	Parallel Reaction Monitoring
PVC	Polyvinylchlorid
RP	Umkehrphase (engl. Reverse Phase)
RSD	Relative Standardabweichung (engl. Relative Standard Deviation)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SILAC	engl. Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture
SIMS	Sekundärionen-Massenspektrometrie
SPM	Rastersondenmikroskopie
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TIMS	engl. Trapped Ion Mobility Spectrometry
T _m	Schmelztemperatur
TMT	engl. Tandem Mass Tag
ToF	Flugzeitmassenanalysator (engl. Time-of-Flight Mass Analyzer)
TQ	Tandem-Quadrupol
UV	Ultraviolett
XPS	Photoelektronenspektroskopie

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Adsorption.....	21
Abbildung 2: Entstehung von Fragmentionen nach Fragmentierung mittels CID, HCD oder ETD.....	26
Abbildung 3: Workflow der Massenspektrometrie-basierten Bottom-up-Proteomik.....	27
Abbildung 4: Klassifizierung der Aminosäuren basierend auf der Polarität und Ladung ihrer Seitenkette.....	28
Abbildung 5: Quantifizierung mittels Tandem-Quadrupol.....	31
Abbildung 6: Schematische Darstellung des APS-Assays für Gefäße von Hersteller A, B und C.....	58
Abbildung 7: Schematische Darstellung des APS-Assays für Gefäße von Hersteller D.....	59
Abbildung 8: Modifikationen von Peptiden infolge der Inkubation in 0,1 % Ameisensäure....	60
Abbildung 9: Schematische Darstellung der durch Normalisierung hervorgerufenen Datenverzerrung.....	61
Abbildung 10: Varianzkoeffizient der Replikatmessungen vor und nach Inkubation.....	62
Abbildung 11: Boxplot-Darstellung der Pearson-Korrelationskoeffizienten zwischen verschiedenen Gefäßtypen und Proben der jeweiligen Hersteller.....	63
Abbildung 12: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Peptidabundanzen vor und nach Inkubation.....	64
Abbildung 13: Volcano-Plot-Darstellung signifikanter Peptidveränderungen nach Inkubation in PP- und m-PP-Gefäßen.....	66
Abbildung 14: Volcano-plot-Darstellung signifikanter Peptidveränderungen nach Inkubation in G- und m-G-Gefäßen.....	67
Abbildung 15: Analyse der Überschneidung adsorbierter Peptide zwischen verschiedenen PP-Gefäßtypen.....	68
Abbildung 16: Analyse der Überschneidung adsorbierter Peptide an Glas-(G) und modifizierten Glas-(m-G) Gefäßen von Hersteller D.....	69
Abbildung 17: Analyse der Aminosäurezusammensetzung adsorbierter und nicht-adsorbierter Peptide.....	70
Abbildung 18: Analyse des Einflusses der Peptidlänge auf die Adsorption.....	72
Abbildung 19: Vergleich der Peptidladung zwischen adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden.....	73
Abbildung 20: Vergleich der Hydrophobizität (GRAVY-Wert) zwischen adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden.....	74
Abbildung 21: Beispielhafte APS-Assay-Ergebnisse für PP-Gefäße von Hersteller A.....	77
Abbildung 22: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der APS-Ergebnisse zum Vergleich von modifizierten Polypropylen-Platten (m-PP, Hersteller A) mit herkömmlichen PP-Platten.....	78
Abbildung 23: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der APS-Ergebnisse zum Vergleich von 1,5 mL m-PP- und PP-Gefäßen von Hersteller A.....	79
Abbildung 24: APS-Assay-Ergebnisse der 1,5-mL-PP-Gefäße von Hersteller A nach Messung aus m-PP-Platte.....	80
Abbildung 25: APS-Assay-Ergebnisse der 1,5-mL-m-PP-Gefäße von Hersteller A nach Messung aus m-PP-Platte.....	81
Abbildung 26: Volcano-Plot der differentiell quantifizierten Proteine nach Inkubation in PP-Gefäßen von Hersteller A.....	83

Abbildung 27: Top 4 adsorbierte Proteine und ihre Peptide.	84
Abbildung 28: Bubble-Plot der KEGG-basierten GSEA nach 24-stündiger Inkubation in PP-Gefäßen.	85
Abbildung 29: Chromatogramm der TQ-MS-basierten MRM-Messung des hydrophoben Peptids.	90
Abbildung 30: Kalibriergeraden des hydrophoben und hydrophilen Peptids auf dem Tandem-Quadrupol-MS.	91
Abbildung 31: Kinetik der Peptidadsorption an Autosampler-Gefäße aus Polypropylen (PP) und Glas (G) von Hersteller E.	92
Abbildung 32: Relative Quantifizierung der Peptidabundanzen nach Inkubation in 0,1 % Ameisensäure in Wasser (pH 2,7) in PP- und m-PP-Gefäßen des Herstellers A.	93
Abbildung 33: Relative Quantifizierung der Peptidabundanzen nach Inkubation in Wasser (pH 7) in PP- und m-PP-Gefäßen des Herstellers A.	94
Abbildung 34: Relative Quantifizierung der Peptidabundanzen nach Inkubation in 50% Acetonitril in Wasser in PP- und m-PP-Gefäßen des Herstellers A.	94
Abbildung 35: Relative Quantifizierung der Peptidabundanzen des hydrophoben Peptids SINPDEAVYYGAAVQAAILSGDK mit und ohne FITC-Label nach Inkubation in 0,1 % Ameisensäure (pH 2,7) und DPBS (pH 7,2) in PP-Gefäßen des Herstellers A.	96
Abbildung 36: Verteilung der Hydropathie-Werte über die adsorbierten Peptide.	98
Abbildung 37: AlphaFold 3-basierte Proteinstruktur des Heat Shock Cognate 71 kDa Proteins.	100
Abbildung 38: CD-Spektren des Peptids SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK in verschiedenen Lösungsmitteln.	101
Abbildung 39: Bestimmung der Sekundärstrukturanteile des Peptids SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK in verschiedenen Lösungsmitteln.	103
Abbildung 40: Temperaturabhängige CD-Messung des Peptids SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK zur Untersuchung der Stabilität von β -Faltblattstrukturen.	106
Abbildung 41: Aggregations-Hotspot-Analyse des Peptids SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK.	107
Abbildung 42: APS-Assay von PP von Hersteller A basierend auf Peptiden mit maximaler Peptidlänge von 15 Aminosäuren.	108

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gefäße aus Polypropylen oder modifiziertem Polypropylen mit 1,5 mL Fassungsvermögen	38
Tabelle 2: Autosampler-geeignete Gefäße	39
Tabelle 3: HeLa Protein-Abbau-Standard	40
Tabelle 4: Synthetische Peptide.....	40
Tabelle 5: Auflistung verwendeter Chemikalien.....	40
Tabelle 6: Verwendete Geräte	41
Tabelle 7: Verwendete Vorsäulen und analytische Säulen für die LC-MS-Analyse.....	41
Tabelle 8: Verwendete Software	42
Tabelle 9: Instrumentenparameter für die MRM-Messungen auf dem Agilent Ultivo TQ.....	52
Tabelle 10: Fragmentor-Spannung, MRM-Übergänge der Vorläuferionen (Quantifier und Qualifier) und Kollisionsenergien (CE).	52
Tabelle 11: Benetzte Oberfläche von PP- und m-PP-Gefäßen bei identischem Probenvolumen.	56
Tabelle 12: Anzahl der Peptide, die nach der Inkubation in keinem Replikat mehr quantifiziert wurden.	69
Tabelle 13: Genset Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection aus der KEGG-basierten GSEA-Analyse.	86
Tabelle 14: Genset „Prion Disease“ aus der KEGG-basierten GSEA-Analyse.....	87
Tabelle 15: Top 10 der adsorbierten Peptide an PP von Hersteller A, B und C.	97
Tabelle 17: Sekundärstrukturvorhersage des Peptids SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK in unterschiedlichen Lösungsmitteln.	104

1. Zusammenfassung

Die Adsorption von Molekülen an Oberflächen ist eine unterschätzte Fehlerquelle in der Analytik. Sie kann zu Probenverlusten und falschen quantitativen Ergebnissen führen. Dieses Problem betrifft jeden Analyten. In den verschiedenen Omics-Disziplinen ist dieses Problem besonders relevant, da im Gegensatz zur Analytik einzelner oder weniger Analyten der Einsatz interner Standards nicht möglich ist. Das Ausmaß der Adsorption wird maßgeblich durch die Kombination aus verwendeter Oberfläche (feste Phase) und der Zusammensetzung des Lösungsmittels (flüssige Phase), in dem der Analyt gelöst ist, sowie durch die chemischen Eigenschaften des Analyten bestimmt.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Validierung standardisierter Assays, mit denen sich Adsorptionsprozesse von Molekülen abhängig von der flüssigen und der festen Phase reproduzierbar charakterisieren und quantifizieren lassen. Typische feste Phasen, mit denen gelöste Analyten während der Probenvorbereitung in Kontakt kommen, sind Probengefäße, Mikrotiterplatten oder Pipettenspitzen. Zur Charakterisierung der Wechselwirkungen wurden für den Assay tausende tryptische Peptide eines Referenzgemisches als Sonden gewählt, die eine große Vielfalt unterschiedlicher physikochemischer Eigenschaften bieten. Diese wurden vor und nach Kontakt mit festen Oberflächen direkt mittels differentieller Bottom-up-Proteomik unter Nutzung der Flüssigkeitschromatographie-gekoppelten Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) quantifiziert. Eine Adsorption liegt vor, wenn nach der Inkubation eine signifikante Abnahme der Menge eines Peptids in der flüssigen Phase gemessen wurde. Durch den Blick auf die chemischen Eigenschaften wie Länge, Hydrophobizität und Ladung der adsorbierten Peptide konnten Rückschlüsse auf die Art und Stärke der Wechselwirkung gezogen werden. Der entwickelte Assay wurde als „Adsorption-Properties-of-Surfaces-Assay“ (APS-Assay) bezeichnet.

Der APS-Assay wurde getestet, indem die Adsorptionseigenschaften der Oberflächen von kommerziell erhältlichen Probengefäßen aus Polypropylen (PP) und Glas (G) unter Verwendung des gleichen Lösungsmittels (0,1 % Ameisensäure in Wasser) untersucht wurden. PP-Gefäße wiesen eine signifikante Adsorption zahlreicher hydrophober Peptide aufgrund hydrophober Wechselwirkungen auf, während einige modifizierte PP-Oberflächen keine Adsorption zeigten. Bei Glasgefäßen konnte eine starke Adsorption einer großen Zahl von Peptiden festgestellt werden, die unter anderem durch elektrostatische Wechselwirkungen bedingt war. Die Folgen dieser Adsorption ließen sich anhand veränderter Proteinabundanzen in der differentiellen quantitativen Proteomanalytik nachweisen, was zu Fehlinterpretationen biologischer Prozesse führte. Die Analyse der chemischen Eigenschaften der adsorbierten Peptide ergab, dass auch die Sekundärstruktur die Adsorption der Peptide an Oberflächen

beeinflusst. Konformationsabhängige Effekte wurden experimentell mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie bestätigt und bei der Etablierung des APS-Assays berücksichtigt. Zur Automatisierung der Auswertung wurde ein Python-basiertes Skript entwickelt, das eine effiziente und umfassende Bewertung der Adsorptionsprozesse ermöglicht. Auf Grundlage der APS-Assay-Ergebnisse wurde ein vereinfachter, Multiple Reaction Monitoring-basierter „Fast-Assay“ entwickelt. Die gezielte Auswahl von wenigen Peptiden aus dem Referenzgemisch mit eindeutigen chemischen Eigenschaften ermöglicht eine schnelle Quantifizierung der Adsorption bedingt durch Wechselwirkungen an Oberflächen in Abhängigkeit von den verwendeten Lösungsmitteln.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass Adsorption ein selektiver, physikochemisch determinierter Prozess ist, der bei der experimentellen Planung berücksichtigt werden sollte. Der APS-Assay und der darauf aufbauende Fast-Assay stellen Verfahren dar, mit denen sich Kombinationen von Lösungsmittel und Oberflächen ermitteln lassen, die den Verlust von Analyten durch Adsorption minimieren.

2. Abstract

The adsorption of molecules on surfaces is an underestimated source of error in analytics. It can lead to sample losses and incorrect quantitative results. This problem affects every analyte. It is particularly relevant in the various omics disciplines, as unlike in the analysis of individual or fewer analytes, the use of internal standards is not possible. The extent of adsorption is largely determined by the combination of the surface used (solid phase) and the composition of the solvent (liquid phase) in which the analyte is dissolved, as well as by the chemical properties of the analyte.

The aim of this work was to develop and validate standardized assays that can be used to reproducibly characterize and quantify adsorption processes of molecules depending on the liquid and solid phases. Typical solid phases with which dissolved analytes come into contact during sample preparation are sample vessels, microtiter plates, or pipette tips. To characterize the interactions, thousands of tryptic peptides from a reference mixture were selected as probes for the assay, offering a wide variety of different physicochemical properties. These were quantified directly before and after contact with solid surfaces using differential bottom-up proteomics coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Adsorption occurs when a significant decrease in the amount of a peptide in the liquid phase is measured after incubation. By looking at the chemical properties such as length, hydrophobicity, and charge of the adsorbed peptides, conclusions could be drawn about the type and strength of the interaction. The assay developed was named the "Adsorption Properties of Surfaces Assay" (APS-Assay).

The APS-Assay was tested by examining the adsorption properties of the surfaces of commercially available sample vessels made of polypropylene (PP) and glass (G) using the same solvent (0.1% formic acid in water). PP vessels showed significant adsorption of numerous hydrophobic peptides due to hydrophobic interactions, while some modified PP surfaces showed no adsorption. In glass vessels, strong adsorption of a large number of peptides was observed, which was in part caused by electrostatic interactions. The consequences of this adsorption could be demonstrated by altered protein abundances in differential quantitative proteomics, which led to misinterpretations of biological processes. Analysis of the chemical properties of the adsorbed peptides revealed that the secondary structure also influences the adsorption of peptides to surfaces. Conformation-dependent effects were confirmed experimentally using circular dichroism spectroscopy and taken into account when establishing the APS-Assay. A Python-based script was developed to automate the evaluation, enabling efficient and comprehensive assessment of the adsorption processes. Based on the APS-Assay results, a simplified, multiple reaction monitoring-based "Fast-Assay" was developed. The targeted selection of a few peptides from the reference mixture with

unique chemical properties enables rapid quantification of adsorption due to interactions at surfaces depending on the solvents used.

The results illustrate that adsorption is a selective, physicochemically determined process that should be taken into account in experimental planning. The APS-Assay and the Fast-Assay based on it are methods for determining combinations of solvents and surfaces that minimize the loss of analytes through adsorption.

3. Einleitung

3.1. Relevanz von Adsorptionsprozessen in der analytischen Chemie

Die qualitative und quantitative Analyse von Molekülen stellt eine zentrale Aufgabe der analytischen Chemie dar und bildet die Grundlage für verlässliche wissenschaftliche Aussagen sowohl in Forschung als auch Industrie. Eine präzise Detektion ist dabei entscheidend, um Messdaten korrekt zu interpretieren.

Zur Analyse werden unterschiedliche Methoden eingesetzt, abhängig von Art, Konzentration und Komplexität der Probe. Klassische spektroskopische Verfahren wie UV/Vis- und Infrarotspektroskopie oder die Massenspektrometrie (MS) ermöglichen eine schnelle und einfache Bestimmung einzelner Moleküle (Coll-Satue et al., 2024), während die Kombination mit chromatographischen Techniken wie der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder der Gaschromatographie (GC) die Trennung und anschließende quantitative Analyse komplexerer Probenmischungen erlauben (Law et al., 2022). Moderne LC- oder GC-MS-basierte Ansätze bieten, durch Hochauflösung und/oder Tandem-Massenspektrometrie, zusätzlich eine hohe Selektivität und Sensitivität, die selbst Nachweis und Quantifizierung von Molekülen in sehr niedrigen Konzentrationen ermöglicht. (Aebersold & Mann, 2003; Murphy et al., 2021).

Diese Analysen erfordern in der Regel, dass die Analyten zur Quantifizierung in löslicher Form vorliegen. Sind die Analyten nicht bereits in Flüssigkeiten wie Körperflüssigkeiten gelöst, müssen sie aus ihrer ursprünglichen Matrix in ein Probenlösungsmittel überführt werden. Gewebe wird in der Regel homogenisiert, um die Analyten freizusetzen. Anschließend können zusätzliche Schritte zur Probenvorbereitung erforderlich sein, wie beispielsweise die Entfernung störender Moleküle oder die Anreicherung von Analyten. Auf ihrem Weg von ihrer ursprünglichen Quelle zum Analysegerät durchlaufen die Analyten verschiedene Gefäße und Kapillaren, die oft aus unterschiedlichen Materialien bestehen.

Insbesondere in den Omics-Bereichen (insbesondere Proteomik, Metabolomik, Lipidomik), der Pharmakologie und der klinischen Diagnostik hängt die Validität experimenteller Ergebnisse entscheidend von der Genauigkeit der quantitativen Analyse ab (Dowell et al., 2021). Dabei können bereits kleinste Verluste von Analyten die Messergebnisse erheblich verfälschen. Ein wesentlicher, oft unterschätzter Einflussfaktor ist die Adsorption der Analyten. Moleküle, die an Oberflächen haften, stehen in Lösung nicht mehr zur Verfügung, was systematische Fehler verursachen und die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit von Experimenten beeinträchtigen kann (van Midwoud et al., 2007). Wenn nur ein einziger oder wenige bekannte Analyten quantifiziert werden, kann ihr Verlust während der Probenvorbereitung durch die Anwendung interner Standards ausgeglichen werden. In Omics-Studien werden jedoch in der

Regel tausende Analyten quantifiziert. Für diese Studien ist die Integration interner Standards für jeden einzelnen Analyten zu zeitaufwändig und zu teuer. Darüber hinaus sind in vielen Omics-Studien die Identitäten der Analyten vor der Analyse nicht bekannt, sodass interne Standards nicht anwendbar sind.

Daher ist es notwendig, die Grundlagen der Adsorption, deren Einfluss auf analytische Prozesse und mögliche Strategien zur Minimierung solcher Verluste zu verstehen. Im Folgenden werden die Mechanismen der Adsorption, ihre Relevanz für die Bottom-up-Proteomik sowie Methoden zu ihrer Charakterisierung erläutert.

3.2. Grundlagen der Adsorption an Oberflächen

3.2.1. Definition und relevante Modelle

Adsorption bezeichnet die Anlagerung von Molekülen (Adsorbat) aus einer Flüssigkeit oder Gasphase an eine Festphase (Adsorbens) innerhalb der Grenzfläche (Abbildung 1). Man unterscheidet zwischen Physisorption, die auf schwachen, nicht-kovalenten Wechselwirkungen wie Van-der-Waals-Kräften basiert, und Chemisorption, die durch starke, kovalente Bindungen charakterisiert ist. Während bei der Physisorption auch Mehrschichten möglich sind, beschränkt sich Chemisorption meist auf eine Monolage (Adamson & Gast, 1997).

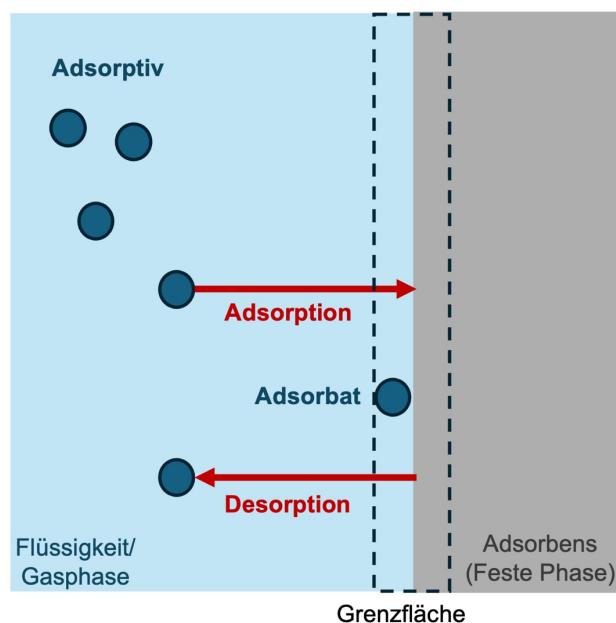


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Adsorption.

Die Adsorption an feste Phasen stellt einen dynamischen Gleichgewichtsprozess dar, bei dem Adsorption und Desorption nach einer bestimmten Zeit ein thermodynamisches Äquilibrium erreichen. Die Zeit bis zum Erreichen des Gleichgewichts variiert in Abhängigkeit von den Eigenschaften der adsorbierten Moleküle, der Beschaffenheit des Adsorbens, der

Anfangskonzentration sowie weiteren Parametern, die die flüssige Phase beeinflussen (Gupta et al., 2021).

Zur Beschreibung von Adsorptionsprozessen wurden verschiedene Adsorptionsmodelle vorgeschlagen. Die bekanntesten sind die Langmuir- (Langmuir, 1918), Freundlich- (Freundlich, 1907) und Brunauer–Emmett–Teller–(BET)–Isothermen (Brunauer et al., 1938). Jedes dieser Modelle basiert auf unterschiedlichen theoretischen Annahmen und ist nur unter bestimmten Bedingungen anwendbar (Latour, 2015). Das Langmuir–Isotherm geht von einer homogenen Oberfläche aus, auf der jede Adsorptionsstelle nur ein Molekül aufnehmen kann. Es berücksichtigt die Sättigung der Oberfläche und beschreibt das Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption bei gleichbleibender Temperatur. Das Modell eignet sich besonders für Monolagen auf kristallinen, homogenen Oberflächen. Im Gegensatz zum Langmuir–Modell kann das BET–Modell auch multilagige Adsorption abbilden (Latour, 2015). Das BET–Modell wird primär zur Beschreibung der Gasadsorption an Feststoffen verwendet und ist für Adsorptionsprozesse aus Flüssigkeiten nur eingeschränkt anwendbar (Ebadi et al., 2009). Das Freundlich–Modell ist ein empirisches Modell, das die Adsorption auf heterogenen Oberflächen beschreibt. Es berücksichtigt, dass Bindungsenergien auf der Oberfläche variieren. Das Freundlich–Modell nimmt keine Oberflächensättigung an, weshalb es bei sehr hohen Analytenkonzentrationen physikalisch nicht begründet ist.

Aktuelle Entwicklungen zur Modellierung und Vorhersage der Adsorption an Oberflächen werden im weiteren Verlauf der Einleitung (Kapitel 3.4.3) vorgestellt.

3.2.2. Einflussfaktoren auf die Adsorption von Analyten an Oberflächen

Zu den wichtigsten Faktoren, die die Adsorption von Molekülen an Oberflächen an der Flüssig–Fest–Grenzfläche beeinflussen, gehören die Art des Lösungsmittels und seine Zusammensetzung, die chemischen Eigenschaften des Analyten und die Beschaffenheit und chemische Zusammensetzung der Oberfläche (Adamson & Gast, 1997).

Abhängig von den chemischen Eigenschaften der Moleküle können diese unterschiedliche Wechselwirkungen mit den auf Oberflächen exponierten chemischen Gruppen eingehen. Van–der–Waals–Wechselwirkungen entstehen durch temporäre Dipole in allen Molekülen und wirken insbesondere bei unpolaren Molekülen und Oberflächen. Elektrostatische Wechselwirkungen (Coulomb–Interaktionen) treten zwischen permanent geladenen Gruppen oder polaren Regionen von Molekülen und der Oberfläche auf. Sie können sowohl anziehend als auch abstoßend wirken, abhängig von der Ladungsverteilung und den Lösungsmittelbedingungen. Wasserstoffbrückenbindungen entstehen, wenn ein Wasserstoffatom, das kovalent an ein elektronegatives Atom (z. B. Sauerstoff oder Stickstoff)

gebunden ist, mit einem weiteren elektronegativen Atom auf der Oberfläche interagiert. Hydrophobe Effekte beschreiben die Tendenz unpolärer Moleküle, Kontakt mit polaren Lösungsmitteln zu minimieren, indem sie sich an unpolare Oberflächen anlagern (Adamson & Gast, 1997; Norde, 1986).

Die Ausbildung der genannten Wechselwirkungen ist stark abhängig von der Umgebung: Polarität des Lösungsmittels, Ionenstärke, pH-Wert, Temperatur und Puffersysteme modulieren die Anlagerung der Moleküle an Oberflächen erheblich. Zusätzlich kann die Zugabe von Detergenzien die Adsorption weiter beeinflussen, beispielsweise durch den Einsatz von Tensiden wie Tween 20 oder n-Dodecyl-β-D-maltosid (DDM) (Duncan et al., 1995; Hughes et al., 2019).

Auch die Oberflächenstruktur der Festphase hat einen Einfluss auf die Adsorption. So weisen die meisten Oberflächen, die besonders in der analytischen Chemie genutzt werden um Proben zu lagern, keine ideale, glatte Oberfläche auf, sondern sind amorph und uneben (Cohen Stuart et al., 1985; Adamson & Gast, 1997). Darüber hinaus kann die Oberfläche der Festphase in Abhängigkeit von der umgebenden Flüssigkeit unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. So kann beispielsweise Glas abhängig vom Zeta-Potential sowohl polare, geladene Gruppen als auch ungeladene Bereiche besitzen (Gu & Li, 2000; Behrens & Grier, 2001).

3.3. Beispiele ungewollter Adsorption aus Analytik, Pharmazie und Medizin

Die Relevanz zur Untersuchung von Adsorption von Molekülen an Oberflächen lässt sich anhand mehrerer Beispiele aus der medizinischen, pharmazeutischen und analytischen Chemie zeigen.

So zeigten Schlüter und Zidek (Schlüter & Zidek, 1993) im Rahmen der Größenausschlusschromatographie, dass die Lösungsmittelzusammensetzung einen erheblichen Einfluss auf das Elutionsverhalten haben kann. In der Studie wurde die saure Verbindung Vanillinmandelsäure, ein kleines Molekül (Molekulargewicht: 182,17 g/mol), auf einer Sephadex S-100-Säule (Trennbereich 1-100 kDa) mit reinem Wasser als Eluent untersucht. Ohne Zusätze zeigte die Substanz ein Elutionsverhalten, das dem eines Proteins mit einer Größe von > 50 kDa entsprach, und eluierte nahe dem Totvolumen der Säule. Bei Zugabe von 200 mM NaCl eluierte das Molekül erwartungsgemäß nahe dem Gesamtvolumen der Säule (V_t). Dieser Effekt wurde auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der Vanillinmandelsäure und den Carboxylgruppen der Dextran-Ketten der Sephadex-Matrix zurückgeführt. Die Interaktion verursachte eine Abstoßung, die verhinderte, dass das kleine Molekül in die Poren der chromatographischen Matrix gelangte. Die Zugabe von NaCl

unterdrückte diese elektrostatischen Effekte und verdeutlicht damit, wie stark die Zusammensetzung des Lösungsmittels die Adsorption beeinflussen kann.

Im Bereich der pharmazeutischen Industrie kann die Adsorption von Molekülen Risiken für Patienten bergen. So wurde beispielsweise untersucht, wie Chemotherapeutika in Plastikbeuteln, die zur Verabreichung verwendet werden, interagieren. Wechselwirkungen mit Polyethylen (Low Density Polyethylen, LDPE) (Beitz et al., 1999) sowie Polyvinylchlorid (PVC) (Illum & Bundgaard, 1982) wurden festgestellt. Ähnliche Effekte wurden auch für andere Gefäßtypen zur Lagerung von Medikamenten beschrieben (Mizutani & Mizutani, 1978). Solche Adsorptionsprozesse können zu einer Verringerung der verabreichten Wirkstoffdosis führen und damit die Wirksamkeit der Medikamente beeinträchtigen.

Darüber hinaus stellt auch die Adsorption von Proteinen an Oberflächen ein Problem dar, und wurde in zahlreichen Studien beschrieben (Vogler, 2012; Cordeiro et al., 2019; Kim, 2020) meist im Kontext der Proteinadsorption an Biomaterialien wie Implantaten.

Kleine Verluste von Proteinmengen können jedoch die Analyseergebnisse in empfindlichen analytischen Verfahren wie der Massenspektrometrie-basierten Proteomanalytik erheblich verfälschen. Diesbezüglich wurden von Maes et al. Empfehlungen zur Probenhandhabung veröffentlicht (Maes et al., 2014). In den letzten Jahren ist die Wahrnehmung der Bedeutung von Adsorption in der Proteomanalytik weiter gestiegen, insbesondere durch Fortschritte in der analytischen Miniaturisierung bis hin zur Einzelzellanalytik (Sun & Kumar, 2022) und somit hinsichtlich der Vermeidung von Probenverlusten. Jedoch sind die genauen Auswirkungen der Nichtbeachtung nicht ausreichend erforscht. Da die Proteinmengen hierbei oftmals im niedrigen Nano- bis Pikomol-Bereich liegen, kann Adsorption an Gefäß- und Geräteoberflächen gravierende quantitative Verzerrungen verursachen. Aus diesem Grund wird im folgenden Abschnitt die Bedeutung der Adsorption speziell im Kontext der Bottom-up-Proteomik betrachtet.

3.4. Adsorption in der Bottom-up-Proteomik

3.4.1. Analytischer Workflow der LC-MS-basierten Bottom-up-Proteomik

Die Massenspektrometrie-basierte Bottom-up-Proteomik stellt einen der zentralen Ansätze in der modernen Proteinforschung dar und findet Anwendung sowohl bei der Identifizierung einzelner Proteine aus SDS-PAGE-Gelen (Sperling, 2001) oder Lösungen als auch in der umfassenden Proteomanalyse komplexer Proben. Zu diesen gehören unter anderem Gewebe, Zelllysate oder Körperflüssigkeiten (z. B. Blut, Urin) (Crutchfield et al., 2016). Ziel von Proteomanalysen ist es, eine möglichst vollständige und präzise Zusammensetzung des Proteoms zu erfassen. Das Proteom wird definiert als die Gesamtheit aller Proteine, die in

einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt unter spezifischen Bedingungen exprimiert werden. Es umfasst nicht nur die vorhandenen Proteinmengen, sondern auch Isoformen und posttranskriptionale Modifikationen (Aebersold & Mann, 2003; Duong & Lee, 2023).

Das Grundprinzip der Bottom-up-Proteomik beruht auf einem enzymatischen Verdau der Proteine, der zu kleineren Peptiden führt. Diese Fragmente sind analytisch deutlich leichter zugänglich als intakte Proteine. Der Workflow umfasst typischerweise die Extraktion von Proteinen aus biologischen Proben, deren Denaturierung und Reduktion und Modifikation von Cysteinresten, den enzymatischen Verdau (häufig mit Trypsin), die Aufreinigung der Peptide, ihre chromatographische Trennung und die anschließende Detektion mittels Massenspektrometrie (LC-MS/MS). Die chromatographische Separation erfolgt meist über Flüssigchromatographie, wodurch die Komplexität der Probe vor der Messung reduziert und die Peptide anhand ihrer physikochemischen Eigenschaften getrennt werden. In der Bottom-up-Proteomik erfolgt die Trennung der Peptide standardmäßig mittels hydrophober Wechselwirkungen über Umkehrphasenchromatographie (auch: *Reversed-Phase-Chromatographie (RP)*) bestehend aus mit Octadecyl-Gruppen (C18) modifiziertem Säulenmaterial (Jiang et al., 2024) (siehe Kapitel 3.4.2.).

Die Ionisierung der Peptide erfolgt üblicherweise über Elektrospray-Ionisation (ESI), wobei die Ionen anschließend im Massenspektrometer detektiert werden. Zunächst werden im sogenannten MS1-Scan die Vorläuferionen mit ihren Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen (m/z) bestimmt. Anschließend können ausgewählte Vorläuferionen isoliert und über unterschiedliche Fragmentierungsmethoden, wie Kollisionsdissoziation (z.B. *Collision-Induced Dissociation (CID)* oder *Higher-energy Collisional Dissociation (HCD)*) oder Elektronentransferdissoziation (ETD), fragmentiert werden. Die Analyse der entstehenden MS/MS-Spektren (MS2) erlaubt die Identifikation der Aminosäuresequenz der Peptide anhand der charakteristischen b- und y-Ionen Serien (bzw. c- und z- Ionen bei ETD oder seltener a- und x-Ionen) (Roepstorff & Fohlman, 1984). In Abbildung 2 sind die Annotationen der möglichen Schnittstellen am Peptidrückgrat dargestellt.

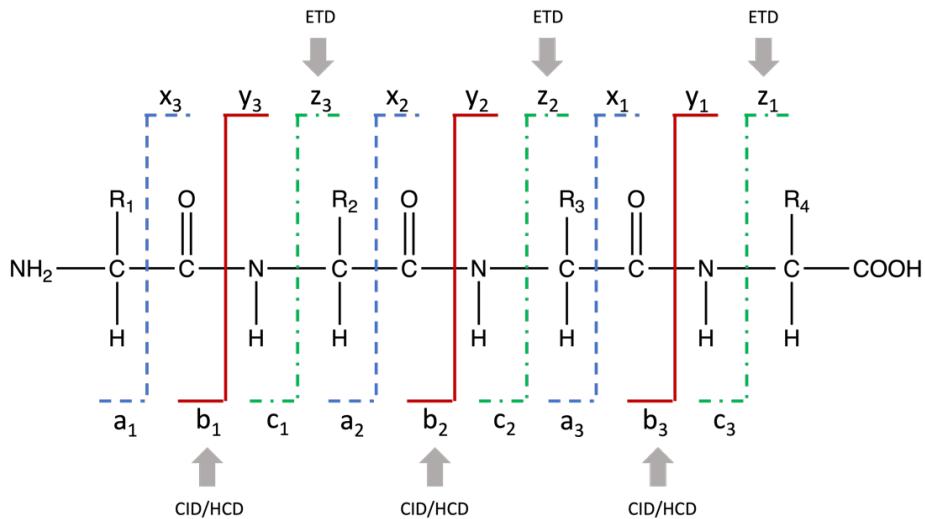


Abbildung 2: Entstehung von Fragmentionen nach Fragmentierung mittels CID, HCD oder ETD.

Eine weitere Fragmentklasse bilden die internen Fragmente sowie die Immoniumionen (Falick et al., 1993). Interne Fragmente entstehen durch Doppelspaltungen innerhalb der Peptidrückgrats und enthalten keine terminalen Enden. Immoniumionen bestehen hingegen aus einem stark verkürzten Fragment, das nur die Seitenkette einer Aminosäure und ein Teilstück des Rückgrats enthält. Ihre Masse liegt 27 Da unter der Masse des entsprechenden Aminosäurerests und sie entstehen meist bei hochenergetischer CID.

Für Messungen im Bereich der Bottom-up-Proteomik kommen hochauflösende Massenspektrometer, gegebenenfalls gekoppelt mit einer zusätzlichen Trennung über die Ionenmobilität, wie Orbitrap-, timsToF- oder FT-ICR-Instrumente zum Einsatz. Moderne Plattformen ermöglichen so die Identifizierung von mehreren tausend Proteinen in einer einzigen Messung (Jiang et al., 2024). Der klassische Workflow ist in Abbildung 3 dargestellt.

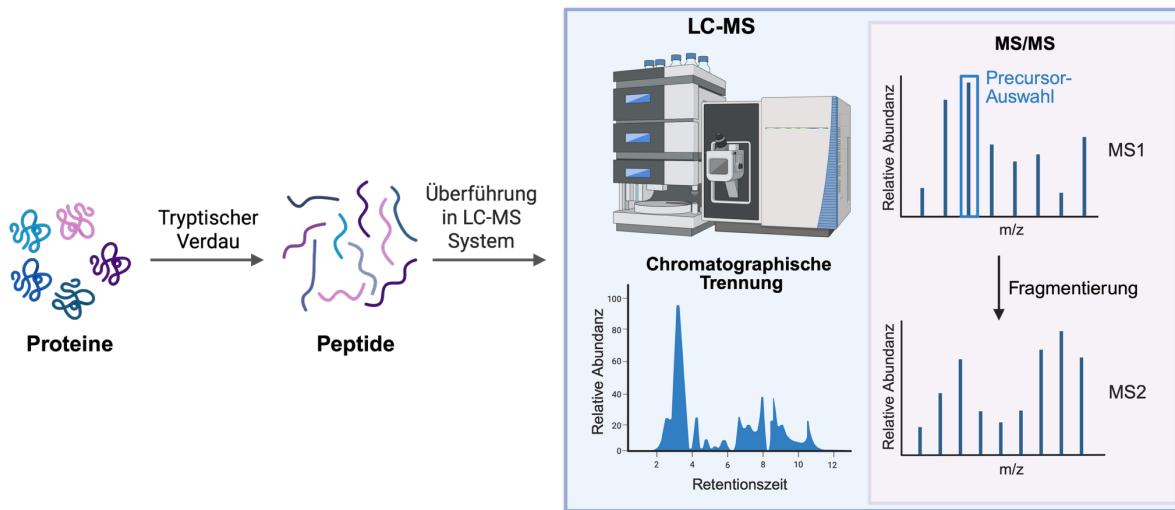


Abbildung 3: Workflow der Massenspektrometrie-basierten Bottom-up-Proteomik. Erstellt mit BioRender.com.

3.4.2. Charakteristika tryptischer Peptide

Peptide sind Polymere bestehend aus einer Abfolge der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren, die sich aufgrund ihrer Seitenketten unterscheiden. Die Seitengruppen lassen sich generell in verschiedene Gruppen klassifizieren, basierend auf ihrer Polarität. Grundsätzlich lassen sich Aminosäuren in vier Hauptgruppen einteilen: (1) hydrophobe Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten, (2) polare, aber ungeladene Aminosäuren, (3) positiv geladene (basische) Aminosäuren und (4) negativ geladene (saurer) Aminosäuren. Hydrophobe Aminosäuren zeichnen sich durch unpolare Seitenketten aus, die meist aus aliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoffresten bestehen. Dazu zählen beispielsweise Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Methionin und Phenylalanin. Polare, aber ungeladene Aminosäuren besitzen Seitenketten mit funktionellen Gruppen wie Hydroxylgruppen (z. B. Serin, Threonin, Tyrosin), Amidgruppen (Asparagin, Glutamin) oder Thiolgruppen (Cystein). Positiv geladene Aminosäuren tragen bei physiologischem pH eine positive Ladung an ihrer Seitenkette. Hierzu zählen Lysin, Arginin und Histidin. Negativ geladene Aminosäuren (Asparaginsäure und Glutaminsäure) tragen eine Carboxylgruppe in ihrer Seitenkette, die unter physiologischen Bedingungen deprotoniert ist und somit eine negative Ladung aufweist. (Berg et al., 2015). Eine Übersicht der Aminosäuren ist in Abbildung 4 dargestellt.

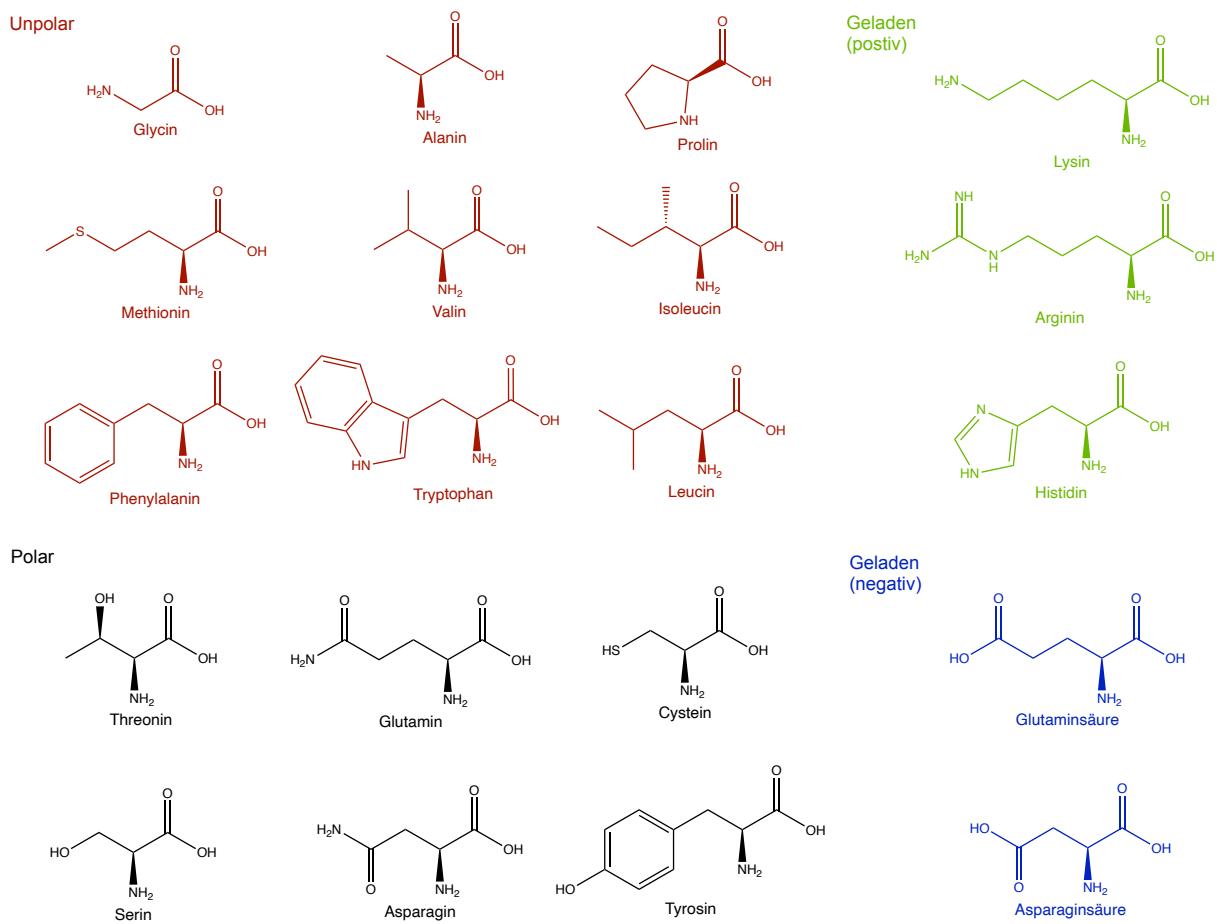


Abbildung 4: Klassifizierung der Aminosäuren basierend auf der Polarität und Ladung ihrer Seitenkette.

Peptide bestehen also basierend auf ihrer Aminosäuresequenz aus unterschiedlichen Anzahlen funktioneller Gruppen, die Einfluss auf die physikochemischen Eigenschaften des Peptids haben. So kann zum Beispiel die Gesamthydrophobizität oder Ladung des Peptids mit Hilfe von Skalen berechnet werden, die basierend auf experimentellen Ergebnissen veröffentlicht wurden.

Zu den bekanntesten Skalen zur Berechnung des Hydrophobizität eines Peptids zählen der GRAVY-Wert (*Grand Average of Hydropathy*) von Kyte und Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982), oder die Skalen von Eisenberg (Eisenberg et al., 1984), Rose (Rose et al., 1985) oder Engelman (Engelman et al., 1986). Zur Berechnung der Gesamthydrophobizität werden die Hydropathie-Werte jeder Aminosäure aufsummiert und anschließend durch die Anzahl der Aminosäuren dividiert. Die Einordnung der Aminosäuren nach ihrer Hydrophobizität kann dabei von einer reinen Betrachtung chemischer Gruppen abweichen.

Zur Bestimmung der Ladung eines Peptids werden die pK_s -Werte der Aminosäuren herangezogen (z.B. nach Bjellqvist et al. (Bjellqvist et al., 1993)). Mithilfe der Henderson-Hasselbalch-Gleichung lässt sich daraus die Netto-Ladung des Peptids bei einem gegebenen pH-Wert berechnen.

Peptide, die durch enzymatischen Verdau mit Trypsin entstehen, werden auch tryptische Peptide genannt. Im Bereich der Bottom-up-Proteomik ist das Trypsin nach wie vor der ‚Gold-Standard‘ zur Erzeugung von Peptiden (Switzer et al., 2013). Das Enzym schneidet Proteine hinter den Aminosäuren Arginin und Lysin und erzeugt dabei Peptide mit einer durchschnittlichen Länge von 14 Aminosäuren (*in silico*-Verdau der *Homo sapiens*-Datenbank) mit mindestens zwei definierten positiven Ladungen, an der Aminogruppe des N-Terminus und den Aminogruppen der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin (Burkhart et al., 2012) bei saurem pH. Zusätzliche positive Ladungen können durch Histidin in der Aminosäuresequenz erzeugt werden. Im Gegensatz zu Proteinen sind Peptide leicht löslich und es werden keine zusätzlichen Detergenzien gebraucht, um sie in Lösung zu bringen, die in der Regel nicht kompatibel mit der Massenspektrometrie sind (Chait, 2006; Jin et al., 2022).

Durch ihre unterschiedlichen Aminosäuresequenzen und Längen variieren tryptische Peptide generell stark in ihren physikochemischen Eigenschaften, insbesondere in ihrer Hydrophobizität, weshalb die Trennung der Peptide vor der Messung im Massenspektrometer meist über RP-Chromatographie erfolgt. Die tryptischen Peptide, gelöst in einem polaren Lösungsmittel (z. B. 0,1 % FA), werden an die stationäre Phase mit hydrophoben C18-Gruppen gebunden und anschließend über einen linearen Anstieg (Gradienten) organischen Lösungsmittels (z. B. Acetonitril (ACN)) eluiert. Die Peptide adsorbieren und eluieren abhängig von ihren physikochemischen Eigenschaften und der Zusammensetzung des Lösungsmittels im Gradienten. Tryptische Peptide aus komplexen Proben bilden also einen Pool an Aminosäuresequenzen unterschiedlichster physikochemischer Charakteristika, die sich sehr gut über geeignete chromatographische Verfahren trennen und durch MS-Kopplung analysieren lassen (Boysen & Hearn, 2011).

Zusätzlich können die Peptide verschiedene Modifikationen aufweisen, die sowohl endogene posttranskriptionale Modifikationen wie beispielsweise Phosphorylierungen, als auch analytisch bedingte Modifikationen umfassen. Letztere entstehen häufig während der Probenaufbereitung, etwa die Carbamidomethylierung von Cystein-Resten, die durch Reduktion und Alkylierung aufgebrochener Disulfidbrücken mit Iodacetamid induziert wird (Jiang et al., 2024). Weitere mögliche Modifikationen sind unter anderem Oxidationen, Acetylierungen, Pyro-Glutamat-Bildungen (Svozil & Baerenfaller, 2017) oder Formylierungen (Zheng & Doucette, 2016), zum Beispiel nach Inkubation in Ameisensäure-haltigen Lösungsmitteln.

3.4.3. Datenanalyse und Quantifizierung

Nach der LC-MS/MS-Messung werden die erfassten Spektren mit einer *in silico*-verdauten Datenbank des Proteoms des analysierten Organismus mittels spezieller Suchalgorithmen

abgeglichen, wobei auch mögliche Modifikationen berücksichtigt werden müssen. Anschließend erfolgt gegebenenfalls die Quantifizierung der identifizierten Peptide und Proteine (Jiang et al., 2024).

Die Quantifizierung ermöglicht es, signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Phänotypen biologischer Proben zu identifizieren, daraus biologische Prozesse abzuleiten, potenzielle Biomarker zu entdecken und die Auswirkungen unterschiedlicher äußerer Einflüsse auf das Proteom zu untersuchen. Besonders in der Krebsforschung, aber auch in der Infektions- und Grundlagenforschung bietet die Proteomanalytik die Möglichkeit, erste Hinweise für eine vertiefte Analyse zu gewinnen (Godbole et al., 2024; Christ et al., 2025; Pereira-Veiga et al., 2025).

Grundsätzlich gibt es in der Proteomanalytik die Möglichkeit sowohl ungezielte (*untargeted*) oder gezielte (*targeted*) Analysen durchzuführen (Jiang et al., 2024). Bei der *untargeted*-Methode hat sich heutzutage vor allem die Label-freie Quantifizierung (LFQ) etabliert. Der Grund hierfür liegt in der Flexibilität und Skalierbarkeit dieser Methode: LFQ erfordert keine chemischen Labels, ermöglicht die Analyse beliebig vieler Proben und ist besonders gut für hochkomplexe Proben mit tausenden Proteinen/Peptiden geeignet. Dennoch kommen auch klassische Label-Methoden wie *Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture* (SILAC), *Tandem Mass Tags* (TMT) oder *Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation* (iTRAQ) zum Einsatz, insbesondere wenn eine hohe quantitative Präzision und Vergleichbarkeit zwischen einer begrenzten Zahl von Proben erforderlich ist. Die Datenanalyse erfolgt durch Integration von Peakflächen (*Area Under Curve*, AUC) und anschließender Berechnung der relativen Unterschiede in der Abundanz der einzelnen Peptide bzw. Proteine über die Proben. Bei Anwendung einer *Data-Dependent Acquisition*-Methode (DDA) werden die Intensitäten der Vorläuferionen (MS1-Level) zur Quantifizierung verwendet. Anschließend können die Abundanzen der Proteine relativ zueinander verglichen werden, um potenzielle Biomarker zu identifizieren, in der Regel über statistische Tests (Eisen et al., 1998). Außerdem kommen, aufgrund der Vielzahl an signifikanten Molekülen, oft sogenannte Enrichment-Analysen zum Einsatz, wie zum Beispiel die Gene-Set-Enrichment-Analyse (GSEA), bei der Proteine nach ihrer Abundanzveränderung (\log_2 -Fold-Change) sortiert und mit vordefinierten Genset-Datenbanken abgeglichen werden, um einen Überblick über die betroffenen biologischen Prozesse zu erhalten (Subramanian et al., 2005).

Targeted-MS-Methoden wie *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) (Stahl-Zeng et al., 2007) oder *Parallel Reaction Monitoring* (PRM) (Pan et al., 2009) können zum Einsatz kommen, um einzelne Peptide mit hoher Selektivität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit nachzuweisen. Die Messung kann sowohl mit hochauflösenden Massenspektrometern als auch mit weniger hochauflösenden, dafür besonders empfindlichen Geräten wie Tandem-Quadrupol-

Massenspektrometern durchgeführt werden. Typische Modi sind hierbei, wie oben bereits erwähnt, PRM für hochauflösende Geräte und MRM für Tandem-Quadrupol-MS (Jiang et al., 2024). Beim MRM werden vordefinierte Vorläuferionen (*Precursor*) gezielt selektiert und fragmentiert. Die Quantifizierung erfolgt anschließend über die Intensitäten der entstehenden Fragmentionen, wobei für eine robuste Quantifizierung in der Regel das intensivste und reproduzierbarste Fragmention genutzt wird (*Quantifier*) während weitere Übergänge als *Qualifier* dienen (Abbildung 5) (Bogusz et al., 2004).

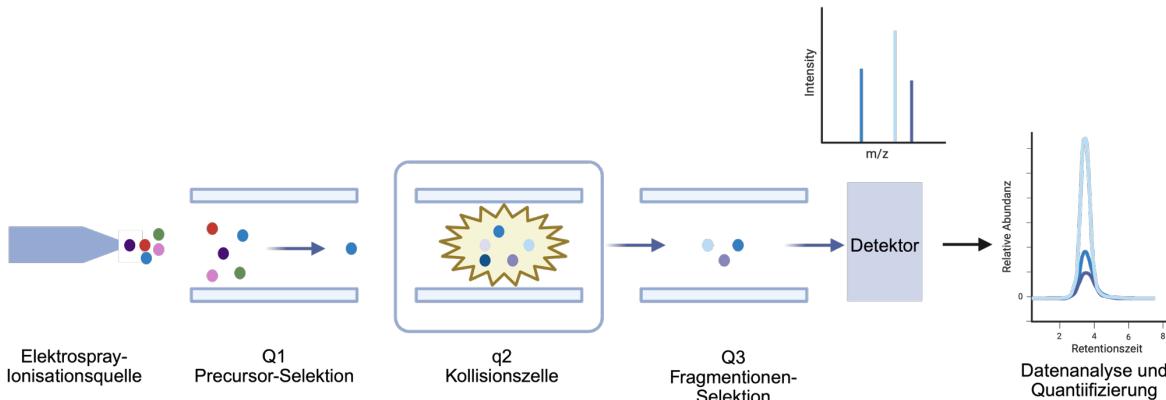


Abbildung 5: Quantifizierung mittels Tandem-Quadrupol. Erstellt mit BioRender.com.

Die absolute Quantifizierung erfolgt meist durch Zugabe isotopenmarkierter Referenzpeptide, die strukturell identisch zu den Zielpeptiden sind. Durch den Vergleich der Signalintensitäten von markierten und nicht markierten Peptiden können anhand einer Kalibriergeraden exakte Konzentrationen bestimmt werden. Diese Strategie wird zum Beispiel eingesetzt, wenn gezielt bereits bekannte Biomarkerproteine quantifiziert werden sollen (Silva et al., 2006).

3.4.4. Ursachen von Peptid-Adsorption

Aufgrund der niedrigen Konzentration vieler Peptide und der hohen Komplexität der Proben ist der Bottom-up-Workflow besonders anfällig für Verluste durch Adsorption. Schon während der frühen Schritte der Probenvorbereitung – Pipettieren, Verdünnen, Lagern der Peptide – können diese irreversibel an Gefäßwänden haften. Diese kumulativen Verluste wirken sich direkt auf die quantitative Aussagekraft der Analysen aus. Die genutzten Gefäße bei der Probenvorbereitung bestehen dabei hauptsächlich aus Polypropylen oder Borosilikatglas, da diese günstig und kompatibel mit den meisten Lösungsmitteln sind. Die genauen chemischen Zusammensetzungen werden jedoch meist nicht durch die Hersteller angegeben. Allerdings ist bekannt, dass beide Materialien potenziell mit Proteinen und Peptiden wechselwirken können, was zu unerwünschten Adsorptionseffekten führt (Norde, 1986). Zur Minimierung solcher Effekte stehen spezielle Alternativen zur Verfügung, etwa „Protein-Low-Bind“-Gefäße verschiedener Hersteller, deren Oberflächen gezielt so behandelt wurden, dass die Bindung von Biomolekülen reduziert werden soll. Darüber hinaus können auch Glasoberflächen

chemisch verändert werden, beispielsweise durch Silanisierung oder Erhitzen, um elektrostatische Wechselwirkungen zu verringern (Laskowski & Kitchener, 1969; Wedler et al., 2022).

Neben der Gefäßwahl haben auch die eingesetzten Lösungsmittel einen Einfluss auf die Adsorption von Analyten. In der Proteomik werden oft schwache Säuren wie Ameisensäure (FA) oder Trifluoressigsäure (TFA) sowie organische Lösungsmittel wie Acetonitril eingesetzt (Hughes et al., 2019). Während saure Lösungsmittel zur Protonierung basischer Aminosäuren und des N-Terminus in Peptiden führen und elektrostatische Wechselwirkungen begünstigen können, ist Acetonitril bekannt dafür Wechselwirkungen zwischen Peptiden und hydrophoben Phasen (siehe Umkehrphasenchromatographie) zu unterbrechen (Karger & Giese, 1978). Ein weiterer kritischer Faktor ist die Probenhandhabung: Jeder zusätzliche Übertrag in ein neues Gefäß erhöht das Risiko von Verlusten durch Adsorption.

In der klassischen Bottom-up-Proteomik lassen sich interne Standards zwar für einzelne oder wenige bekannte Peptide einsetzen, doch bei Tausenden Peptiden in komplexen Proben ist dies praktisch unmöglich für alle Analyten anwendbar. Diese Problematik wird bei der Einzelzellproteomik noch kritischer: Dort sind die verfügbaren Proteinmengen sehr niedrig (ca. 100-500 pg Gesamtprotein pro Zelle) (Y. Wang et al., 2024). Selbst minimale Verluste durch Adsorption an Gefäßoberflächen können hier dazu führen, dass bestimmte Peptide gar nicht nachgewiesen werden. Die Kombination aus niedriger Konzentration, hoher Peptidvielfalt und Miniaturisierung der Probenhandhabung macht Adsorptionsverluste zu einem zentralen Limitierungsfaktor für Sensitivität und Reproduzierbarkeit in der Einzelzellproteomik.

3.5. Methoden zur Charakterisierung von Oberflächen und deren Adsorptionsverhalten

Im Folgenden werden etablierte Methoden zur Charakterisierung von Oberflächen, zur Modellierung und Vorhersage von Adsorptionsvorgängen sowie zur analytischen Erfassung von Adsorption beschrieben.

3.5.1. Charakterisierung von Oberflächen

Zur Charakterisierung von Oberflächen werden in der Regel mehrere analytische Techniken kombiniert, da einzelne Methoden selten alle relevanten Informationen liefern. Die Oberflächen von Materialien können sich sowohl durch ihre elementare chemische Zusammensetzung als auch ihre Oberflächentopografie und -morphologie unterscheiden. Analytische Methoden, die zur physikalischen sowie chemischen Charakterisierung von Oberflächen genutzt werden lassen sich grob in solche unterteilen, die die äußersten atomaren Schichten untersuchen, und solche, die tiefer in die Oberfläche eindringen (Carraher, 2000).

Zu den etablierten Methoden zählen die Auger-Elektronenspektroskopie (AES) und die Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (XPS), die die elementare Zusammensetzung der obersten atomaren Schichten bestimmt werden kann. Die Rastersondenmikroskopie (SPM) erlaubt die topografische Profilierung von Oberflächen mit nanometergenauer Auflösung. Die Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS) analysiert durch Ionenbeschuss freigesetzte atomare und molekulare Ionen und detektiert Spurenbestandteile bis in den ppm-Bereich. Die Analyse amorpher Bereiche ist ein weiterer wichtiger Aspekt der Materialcharakterisierung. Hierfür werden verschiedene Techniken eingesetzt, darunter Rayleigh-Streuung, Brillouin-Streuung, Raman-Streuung, Doppelbrechung (*Birefringence*), depolarisierte Lichtstreuung, Kleinwinkel-Röntgenstreuung, NMR-Relaxation, Neutronenstreuung, Elektronenbeugung und Elektronenmikroskopie (Carraher, 2000).

Eine weitere Methode zur Charakterisierung von Oberflächen stellt die Kontaktwinkelmessung dar, mithilfe derer man die Hydrophilie oder Hydrophobie einer Oberfläche bestimmen kann, was unter anderem bei modifizierten Glasoberflächen eingesetzt wurde (Laskowski & Kitchener, 1969).

Die Charakterisierung der Oberfläche kann zwar eine Übersicht der theoretisch möglichen Wechselwirkungen mit Analyten ermöglichen, jedoch bieten die Methoden keine Möglichkeit zur direkten Analyse der Adsorption von Molekülen aus Lösungsmitteln an Oberflächen.

3.5.2. Modellierung und Vorhersage von Adsorption

Klassische Modelle, wie sie zum Beispiel von LeVan und Vermeulen (LeVan & Vermeulen, 1981) formuliert wurden, beschreiben Adsorptionsisothermen und Kinetiken vor allem für Gase und kleine Moleküle, basierend auf den Modellen von Freundlich und Langmuir (Freundlich, 1907; Langmuir, 1918). Neuere Arbeiten erweitern die Modellierung der Adsorption an Oberflächen auch auf Proteine und Peptide, deren Adsorptionsverhalten jedoch durch komplexe Faltungszustände und dynamische Konformationsänderungen beeinflusst wird (Manzi et al., 2019; Rabe et al., 2011; Swenson & Stadie, 2019).

Ein verwandter Ansatz findet sich in der Chromatographie, wo die Retentionszeit als Maß für die Stärke der Wechselwirkungen zwischen Analyten und der stationären Phase dient. Diese kann mithilfe von Machine-Learning- oder Deep-Learning-Algorithmen auf Basis molekularer Eigenschaften und Oberflächenparameter vorhergesagt werden. Allerdings werden zur Erstellung solcher Modelle Trainingsdatensets benötigt. Das heißt, es benötigt einen Datensatz an Molekülen, die an der zu untersuchenden Oberfläche adsorbiert haben (Bouwmeester et al., 2021). Auch eine Modellierung der Oberfläche mittels maschinellem

Lernen (Corrente & Neimark, 2025) ist in der Regel nicht möglich, da die exakte chemische Zusammensetzung vieler verwendeter Materialien unbekannt ist.

Zudem kann häufig nicht von einer idealen Oberfläche ausgegangen werden (Wyrzykowska et al., 2025). Insbesondere bei sogenannten „Protein-Low-Bind“-Gefäßen oder speziell modifizierten Kunststoffen unterliegen die Oberflächenzusammensetzungen einem Patentschutz und werden von den Herstellern nicht offen gelegt. Damit fehlt eine zentrale Voraussetzung für eine fundierte Modellierung: die Kenntnis der realen Oberflächeneigenschaften. In der Praxis ist die Vorhersage von Adsorption also durch fehlende Trainingsdaten oder durch die Intransparenz der Materialienzusammensetzung stark limitiert.

3.5.3. Fluoreszenz-basierte Analyse von Adsorption

Die quantitative Bestimmung der Adsorption ist entscheidend, um Verluste während der Probenvorbereitung zu erfassen und experimentelle Ergebnisse korrekt zu interpretieren. Bei der Fluoreszenz-basierten Messung werden Einzelproteine, wie z. B. Brynda et al. am Beispiel des bovinen Serumalbumin (BSA) zeigte, mit einem fluoreszierenden Label wie zum Beispiel Alexa-Fluoren oder Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gelabelt. Sie eluierten die Proteine anschließend und maßen die Fluoreszenz-Signale in der Lösung (Brynda et al., 1978), während auch eine indirekte Messung über das Fluoreszenzsignal des nicht-adsorbierten Proteins möglich ist (Weiß et al., 2024). Es konnte jedoch festgestellt werden, dass fluoreszierende Labels durch ihre chemische Struktur die Adsorption des Moleküls beeinflussen und somit die Analyse verzerren können (Winzen et al., 2016). Diese Form der Analyse lässt nur geringe bis keine Rückschlüsse auf die Mechanismen der Wechselwirkung zu.

Eine weitere Methode zur Identifikation adsorbierender Peptide ist das Phagen-Display. Juds et al. (Juds et al., 2020) nutzten hierfür eine M13-Phagenbibliothek, um mittels Phagen-Display und anschließendem *Next-Generation-Sequencing* Peptide zu identifizieren, die auch nach wiederholtem Waschen an modifiziertem Polypropylen (PP) haften. Die ausgewählten Sequenzen wurden anschließend synthetisiert, mit einem fluoreszierenden Marker (Carboxyfluorescein) versehen und ihre Adsorption über einen fluoreszenzbasierten Assay bestimmt. Wie bereits erwähnt, kann das Anfügen eines fluoreszierenden Tags das physikochemische Verhalten des Peptids verändern, weshalb dieser Ansatz die tatsächliche quantitative Adsorption nur eingeschränkt abbildet. Zudem erlaubten die hohen Kosten der Synthese und Fluoreszenzmarkierung nur die quantitative Untersuchung einer kleinen Auswahl ausgewählter Peptide, sodass die Mehrheit der identifizierten Sequenzen nicht direkt

getestet werden kann. Trotzdem lassen sich mittels dieser Methode die Wechselwirkungen der Peptide und des Materials auf Basis der Aminosäuresequenz qualitativ untersuchen.

3.5.4. LC-MS-basierte Methoden zur Analyse von Adsorption

Eine Methode mit deutlich höherer Sensitivität und Selektivität zur Messung von Analyten-Konzentrationen stellt die Nutzung der Flüssigkeitschromatographie-gekoppelten Massenspektrometrie (LC-MS) dar (siehe Kapitel 3.4.1.).

Murphy et al. adressierten in ihrer Studie das Problem der unspezifischen Adsorption von Peptiden und Proteinen an Kunststoffoberflächen und zeigten, dass diese zu nichtlinearen Kalibrationskurven führen kann. Sie untersuchten dabei ein einzelnes synthetisches Peptid (Vn96) sowie die Modellproteine Apomyoglobin und Carboanhydrase. Durch den Einsatz von „Protein-Low-Bind“-Gefäßen und die Zugabe von Adsorptionsblockern (z. B. Carboanhydrase oder Ubiquitin) konnten lineare Konzentrationsreihen über mehrere Größenordnungen erzielt werden, mit Nachweisgrenzen im Femtomol-Bereich (Murphy et al., 2021). Die Studie zeigt, dass Adsorptionseffekte bei LC-MS-Messungen erheblich sein können, adressiert jedoch nur wenige Modellanalyten und bleibt damit auf einen engen Anwendungsbereich beschränkt. Dasselbe gilt für Warwood et al. die einen tryptisch verdauten Standard-Mix aus sechs Proteinen nutzten und die Peptide mittels Multiple Reaction Monitoring (MRM) quantifizierten (Warwood et al., 2013).

Kraut et al. zeigten hingegen, dass auch die Label-freie Quantifizierung zur Messung der Adsorption genutzt werden kann, mit Fokus auf die Lagerung von Peptiden. Sie nutzten einen Mix von 12 Proteinen, den sie über einen in-Gel-Verdau (Verdau der Proteine mit Trypsin in SDS-Page-Gelbande) durchführten, die Peptide über Replikate aufteilten und ihre Abundanz nach Gefriertrocknung und Lagerung über 28 Tage bei –20 °C analysierten (Kraut et al., 2009). Dabei konnte zwar unterschiedlich starke Adsorption festgestellt werden, die Herstellung des Peptidpools aus den 12 Proteinen führt jedoch zum Risiko von Schwankungen und unterschiedlichen Ergebnissen bei Wiederholung des Assays und gleichzeitig bleibt der Pool an Peptiden unterschiedlicher chemischer Eigenschaften klein.

4. Problemstellung und Ziel der Arbeit

Die Adsorption von Molekülen an Oberflächen während der Probenvorbereitung stellt ein zentrales Problem in der Analytik dar. Bleibt sie unbeachtet, kann dies zu Probenverlusten und falschen Messergebnissen führen.

Die alleinige physikalische und chemische Charakterisierung von Gefäßoberflächen reicht nicht aus, um den Grad und die Ursachen der Adsorption von gelösten Molekülen erfassen zu können. Adsorptionsprozesse entstehen durch Wechselwirkungen verschiedener Art und sind abhängig vom verwendeten Lösungsmittel und seiner Zusammensetzung (z.B. pH-Wert, Polarität, zugesetzte Detergenzien) sowie den chemischen und physikalischen Eigenschaften der Oberfläche. Algorithmen zur Modellierung von Wechselwirkungen zwischen Molekülen und Oberflächen erfordern umfangreiche Trainingsdatensätze sowie präzise Kenntnisse und Modellierbarkeit der Oberflächencharakteristika, die in der Regel nicht verfügbar oder umsetzbar sind. Zur experimentellen Analyse von Adsorptionsprozessen wurden bereits Assays mit kleineren Peptidpools oder einzelnen Standardproteinen entwickelt, um zum Beispiel die Adsorption von Peptiden oder Proteinen an Oberflächen zu untersuchen. Die bisher genutzten Ansätze stoßen jedoch schnell an ihre Grenzen, da sie nur einen begrenzten Ausschnitt möglicher Wechselwirkungen abbilden, anfällig für Reproduzierbarkeitsprobleme sind oder keine Quantifizierung ermöglichen.

Ziel dieser Arbeit ist daher die Entwicklung von Assays zur systematischen Charakterisierung und Quantifizierung von Wechselwirkungen, die abhängig von den Charakteristika der Oberflächen und der Zusammensetzung des Lösungsmittels entstehen. Ein solcher Assay muss die folgenden drei zentralen Komponenten umfassen: (1) ein Referenzgemisch mit Molekülen bekannter physikochemischer Eigenschaften als molekulare Sonden zur Detektion von Wechselwirkungen, (2) Oberflächenmaterialien mit variabler chemischer und physikalischer Beschaffenheit als feste Phase und (3) unterschiedliche Lösungsmittelsysteme mit definierter Zusammensetzung als flüssige Phase.

Zu diesem Zweck wird zunächst ein komplexes Referenzgemisch aus mehreren tausend tryptischen Peptiden mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften eingesetzt. Die Peptide dienen als molekulare Sonden, deren Abundanzveränderungen mithilfe der Flüssigkeitschromatographie-basierten Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)-basierten differentiellen quantitativen Analytik erfasst werden. Auf diese Weise können Art und Stärke der Wechselwirkungen bestimmt werden. Auf Grundlage dieser Ergebnisse soll durch die gezielte Auswahl repräsentativer Peptide ein weiterer, vereinfachter Assay entwickelt werden, der eine schnelle und reproduzierbare Untersuchung von Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Oberflächen unter variierenden Lösungsmittelbedingungen ermöglicht.

Eine Anwendung dieser Assays besteht in der systematischen Testung der Wechselwirkungen von Reaktionsgefäß en und Mikrotiterplatten in Abhängigkeit von den verwendeten Lösungsmitteln und deren Zusammensetzung. In dieser Arbeit sollen deshalb am Beispiel von typischerweise in der Bottom-up-Proteomik genutzter Gefäße und Lösungsmittel Parameter gefunden werden, die den Verlust von Molekülen durch Adsorption an die jeweiligen Oberflächen minimieren.

5. Material und Methoden

5.1. Material

5.1.1. Getestete Gefäße

Tabelle 1: Gefäße aus Polypropylen oder modifiziertem Polypropylen mit 1,5 mL Fassungsvermögen.

Bezeichnung	Materialtyp	Kürzel	Hersteller	Katalognummer
Safe-Lock Tubes	Polypropylen (PP)	PP Hersteller A	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)	0030120086
Pierce™ Microcentrifuge Tubes		PP Hersteller B	Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, USA)	69715
SafeSeal- Reaktionsröhrenchen		PP Hersteller C	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)	72.706
Protein LoBind® Tubes	Modifiziertes Polypropylen (m-PP)	m-PP Hersteller A	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)	0030108116
Low Protein Binding Microcentrifuge Tubes		m-PP Hersteller B	Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, USA)	90410
SafeSeal- Reaktionsröhrenchen, Low Protein-Binding		m-PP Hersteller C	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)	72.706.600

Tabelle 2: Autosampler-geeignete Gefäße

Bezeichnung	Materialtyp	Kürzel	Hersteller	Katalognummer
1 mL LCGC Certified Clear Glass, Total Recovery	Glas (G)	G Hersteller D	Waters (Milford, USA)	186000385C
1 mL TruView pH Control LCMS Certified Clear Glass, Total Recovery	Modifiziertes Glas (m-G)	m-G Hersteller D		186005669CV
Eppendorf twin.tec® PCR Plate 96	Polypropylen (PP)	PP-Platte Hersteller A	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)	0030128648
Eppendorf twin.tec® PCR Plate 96 LoBind®	Modifiziertes Polypropylen (m-PP)	m-PP- Platte Hersteller A		0030129512
Gewindeflasche, N 9, mit konischem Einsatz	Glas (G)	G Hersteller E	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)	REF 702284 + REF 702813
Gewindeflasche, N 9, Innenkonus, PP braun	Polypropylen (PP)	PP Hersteller E		REF 702172

5.1.2. Peptide und Chemikalien

Tabelle 3: HeLa Protein-Abbau-Standard

Artikel	Hersteller	Katalognummer
Pierce™ HeLa Protein-Abbau-Standard	Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, USA)	88328

Tabelle 4: Synthetische Peptide

Name	Label	Sequenz	Masse (g/mol)	Hersteller
Hydrophob	-	SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK	2260,45	Life Tein (Somerset, USA)
Hydrophob-FITC	N-terminal FITC-Ahx		2762,99	
Hydrophil	-		1442,44	
Hydrophil-FITC	N-terminal FITC-Ahx		1944,97	

Tabelle 5: Auflistung verwendeter Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller	Katalognummer
Ameisensäure (LC-MS-Qualität)	Fisher Chemical (Schwerte, Deutschland)	A117-50
Wasser (für LC-MS)	Th. Greyer (Renningen, Deutschland)	455.1000
Acetonitril (für LC-MS)	Th. Greyer (Renningen, Deutschland)	2697.1000
n-Dodecyl-β-D-maltosid	Merck (Darmstadt, Deutschland)	D4641-1G
Wasser, LiChrosolv® (für LC-MS)	Merck (Darmstadt, Deutschland)	1.15333.2500
Acetonitril (für LC-MS) CHROMASOLV®	Riedel-de Haen Honeywell (Seelze, Deutschland)	1.15333.2500
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung	Thermo Fisher Scientific (Gibco), (Darmstadt, Deutschland)	14190144
2,2,2-Trifluorethanol (ReagentPlus)	Merck (Darmstadt, Deutschland)	T63002

5.1.3. Geräte und Chromatographiesäulen

Tabelle 6: Verwendete Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller	Katalognummer
Vanquish™ neo UHPLC System	Thermo Fisher Scientific (Bremen, Deutschland)	VN-S10-A-01
Dionex UltiMate 3000 RSLCnano System	Thermo Fisher Scientific (Bremen, Deutschland)	k. A.
Orbitrap Exploris 480	Thermo Fisher Scientific (Bremen, Deutschland)	BRE725539
Orbitrap QExactive	Thermo Fisher Scientific (Bremen, Deutschland)	IQLAAEGAAPFALGMAZR
1290 Infinity II UHPLC	Agilent (Santa Clara, USA)	k. A.
Ultivo Triple Quadrupole LC/MS (LC/TQ)	Agilent (Santa Clara, USA)	G6465BA
ChiraScan Circular Dichroism Spektrophotometer	Applied Photophysics, (Leatherhead, UK)	k. A.
TC 125 Temperaturcontroller	Quantum Northwest (Liberty Lake, USA)	k. A.

Tabelle 7: Verwendete Vorsäulen und analytische Säulen für die LC-MS-Analyse.

Säulenbezeichnung	Dimensionen	Hersteller	Katalognummer
nanoEase M/Z Peptide BEH C18 Säule	130 Å, 1,7 µm, 75 µm x 250 mm	Waters (Milford, USA)	186008795
Acclaim™ PepMap™ 100 C18 Trap-Säule	100 Å, 5 µm, 100 µm x 20 mm	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)	164750
PepMap™ Neo C18 Trap-Kassette	100 Å, 5 µm, 300 µm x 5 mm	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)	174500
InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 HPLC-Säule	120 Å, 1,9 µm, 2,1 mm x 50 mm	Agilent (Santa Clara, USA)	699675-902

5.1.4. Software

Tabelle 8: Verwendete Software

Software	Version	Hersteller/Quelle
AlphaFold 3	Aufruf am 08.10.2025	DeepMind / EMBL-EBI https://alphafoldserver.com/
BestSel	Aufruf am 08.10.2025	ELTE Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary https://bestsel.elte.hu/index.php
BioRender.com	Aufruf am 13.10.2025	BioRender https://www.biorender.com
ChatGPT	GPT-4o	OpenAI https://chatgpt.com/
ChemDraw	22.0.0	Revvity Signals
ChiraKit	Aufruf am 08.10.2025	SPC-Facility / EMBL-Hamburg https://spc.embl-hamburg.de/
GraphPad Prism	8.0.2	GraphPad Software (Dotmatics)
MassHunter Quantitative Analysis for QQQ	10	Agilent
MassHunter Workstation Optimizer	1.2	Agilent
Microsoft Excel/Word	16.101	Microsoft Corporation
Perseus	1.5.8.5.	Max-Planck-Institut für Biochemie / MaxQuant https://maxquant.net/perseus/
Proteome Discoverer 2.4	2.4.1.15	Thermo Fisher Scientific
Proteome Discoverer 3.1	3.1.0.638	Thermo Fisher Scientific
Python	03.10.09	Python Software Foundation
R Studio	2023.12.1+402	Posit PBC
Spyder	05.04.01	Spyder Project / Anaconda
UCSF ChimeraX	1.9	University of California

5.2. Probenvorbereitung, Messung und Analyse zur Entwicklung des APS-Assays

5.2.1. Bestimmung der benetzten Oberfläche

Die Charakterisierung der Innengeometrie der 1,5-mL-Gefäßvarianten aus PP und m-PP von Hersteller A, B und C erfolgte durch Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland). Für jede Gefäßvariante wurden zwei Reaktionsgefäße mittels Computertomographie (CT) analysiert. Der Fokus der Untersuchung lag dabei auf der Erfassung der Innenstruktur der Gefäße.

Die CT-Messungen lieferten Punktwolken, die anschließend einer idealisierten Flächenrückführung unterzogen wurden. Auf Basis dieser rekonstruierten Modelle wurde in der Software Creo Elements die theoretisch benetzte Oberfläche bestimmt. Hierzu wurde ein Volumenkörper mit einem definierten Volumen von 100 µL an das jeweilige Modell angepasst, um die Kontaktfläche zwischen Flüssigkeit und Gefäßinnenwand zu berechnen. Aus den beiden CT-Messungen pro Gefäßtyp wurde jeweils der Mittelwert der theoretisch benetzten Oberfläche gebildet.

5.2.2. Probenvorbereitung

Der lyophilisierte Pierce™ HeLa Protein-Abbau-Standard (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA) wurde in 0,1 % Ameisensäure (FA) in Wasser auf eine Konzentration von 0,25 µg/µL gelöst und als Aliquots bei -20 °C gelagert. Die 1,5-mL-PP-Gefäße und die entsprechenden m-PP-Gefäße der drei Herstellern A, B und C wurden verwendet (Angaben in Tabelle 1), um den APS-Assay zu etablieren. Weiterhin wurden 1-mL-Glasfläschchen und entsprechende Glasfläschchen mit niedriger Retention m-G von Hersteller D (Angaben in Tabelle 1) verwendet. Direkt vor der Messung wurde der HeLa-Protein-Abbau-Standard auf eine Endkonzentration von 5 ng/µL (Gesamtvolumen 100 µL) mit 0,1 % FA in jedem Gefäß verdünnt. Für die Polypropylen-Gefäße wurden 10 µL sofort in Glasfläschchen (G, Hersteller D) für den Autosampler überführt. Ohne Verzögerung wurden 25 ng (5 µL) der HeLa-Peptidlösung aus dem Autosampler-Gefäß in das LC-MS-System injiziert (Kontrolle, 0 h). Um die Peptidadsorptionseffekte der Oberflächen der Gefäße zu messen, wurden 100 µL HeLa-Peptide in den jeweiligen Gefäßen 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 24-stündiger Inkubation wurden 10 µL der Proben in Autosampler-Glasfläschchen überführt, 5 µL wurden sofort in das LC-MS-System injiziert (24 h). Für Glas wurden 5 µL direkt aus den 100 µL HeLa-Peptiden in Glasfläschchen, die im Autosampler bei 4 °C inkubiert wurden, injiziert (n=5).

5.2.3. LC-MS/MS-Analyse

Die LC-MS-Analyse wurde auf einem Nano-UHPLC-System (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt, das mit einem Quadrupol-Orbitrap-Hybrid-

Massenspektrometer (Q Exactive, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gekoppelt war. Die chromatographische Trennung der Peptide erfolgte mit einem Zwei-Puffer-System (Puffer A: 0,1 % FA in Wasser; Puffer B: 0,1 % FA in ACN). Nach dem Laden der Peptide auf eine Vorsäule (Trap, 0,1 mm × 20 mm, 100 Å Porengröße, 5 µm Partikelgröße, C18, Acclaim PepMap 100, Thermo Fisher Scientific) erfolgte die analytische Trennung über eine 25-cm-C18-Reversed-Phase-Säule (75 µm × 250 mm, 130 Å Porengröße, 1,7 µm Partikelgröße, Peptide BEH C18, nanoEase, Waters). Die Peptide wurden über einen 60-minütigen linearen Gradienten getrennt, bei dem die Konzentration von Puffer B von 2 % auf 30 % anstieg. Anschließend erfolgte ein Anstieg auf 90 % über 5 Minuten, gefolgt von einer Äquilibrierung zu 2 % Puffer B für 10 Minuten. Die Gesamtaufzeit betrug 80 Minuten.

Eluierte Peptide wurden mittels Nano-Elektrospray-Ionisation (nano-ESI) ionisiert (1,8 kV) und im *Data-Dependent Acquisition*-Modus (DDA) analysiert. MS1-Spektren wurden mit einer Auflösung von 70.000 im Bereich von m/z 400–1200 aufgenommen. Ionen wurden bis zu einem AGC-Target von 1×10^6 oder einer maximalen Injektionszeit von 240 ms akkumuliert.

Pro MS1-Scan wurden die 15 intensivsten Ionen selektiert, sofern ihre Signalintensität mindestens 5×10^3 betrug und die Ladung zwischen +2 und +5 lag. Diese wurden mit einem Isolationsfenster von m/z 2 isoliert und bei einer normalisierten Kollisionsenergie (NCE) von 25 % fragmentiert. MS2-Spektren wurden mit einer Auflösung von 17.500 (AGC-Target 1×10^5 , maximale Injektionszeit 50 ms) im Bereich ab m/z 100 aufgezeichnet. Bereits fragmentierte Vorläuferionen-Ionen wurden dynamisch für 20 s von einer erneuten Selektion ausgeschlossen.

5.2.4. Datenbanksuche

Die Spektren aus den LC-MS/MS-Messungen wurden mit der Proteome Discoverer-Software (Version 2.4.1.15, Thermo Fisher Scientific, Milford, USA) gegen eine humane SwissProt-Datenbank durchsucht, die im April 2021 mit 20.365 Einträgen heruntergeladen wurde. Als feste Modifikation wurde die Carbamidomethylierung von Cystein-Resten berücksichtigt. Dynamische Modifikationen umfassten die Bildung von Pyroglutamat am N-terminalen Glutamin, Acetylierungen, den Verlust von Methionin, Oxidationen von Methionin und Formylierungen an Serin-, Lysin- und Threonin-Resten.

Für die Suche wurde eine maximale Zahl von zwei fehlenden tryptischen Schnittstellen zugelassen und nur Peptide mit einer Länge zwischen 6 und 144 Aminosäuren wurden berücksichtigt. Zur Sicherstellung einer hohen Identifikationssicherheit wurde ein strenger Cut-off (FDR < 0,01) angewendet. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe des in Proteome Discoverer implementierten Minora-Algorithmus.

5.2.5. Statistische Analyse und Visualisierungen

Die Peptidabundanzen wurden in das statistische Analyseprogramm Perseus (Version 1.5.8.5., Max-Planck-Institut für Biochemie, MaxQuant, München, Deutschland) geladen und log₂-transformiert. Da Rohabundanzwerte von Peptiden und Proteinen typischerweise stark rechtsschief verteilt sind und einzelne hoch-abundante Spezies die statistische Analyse unverhältnismäßig stark beeinflussen können, wurden die Daten vor den statistischen Tests log-transformiert. Durch diese Transformation werden die Verteilungen symmetrischer und nähern sich einer Normalverteilung an, was die Varianzschätzung stabilisiert und die Voraussetzungen für die Anwendung des Welch's t-Tests besser erfüllt (Callister et al., 2006).

Zur Identifikation signifikanter Veränderungen wurde ein Welch's t-Test zwischen den Gruppen 0 h und 24 h für Peptide aus Polypropylengefäßen des Herstellers A durchgeführt. Peptide mit einem p-Wert < 0,05 wurden in einer Heatmap mit hierarchischem Clustering auf Basis der Pearson-Korrelation in Perseus visualisiert, wobei modifizierte Peptide farblich hervorgehoben wurden. Die finale Darstellung erfolgte in R (R Core Team, 2022). Oxidierte, formylierte und Pyroglutamat-modifizierte Peptide sowie deren unmodifizierte Gegenstücke wurden manuell aus den Datensätzen entfernt, da diese Modifikationen auf die Inkubation in 0,1 % FA in Wasser zurückzuführen sind. Da modifizierte Peptide nach der Inkubation in erhöhter Abundanz vorlagen, hätten sie die quantitativen Ergebnisse verfälschen können.

Für weiterführende Analysen wurden nur Peptide verwendet, die in allen Replikaten von allen acht getesteten Gefäßtypen quantifiziert wurden, um Adsorptionseffekte zwischen verschiedenen Polypropylen-Gefäßen und Glas-Gefäßen zu vergleichen (basierend auf 3.531 Peptiden).

Eine lineare Hauptkomponentenanalyse (PCA) wurde durchgeführt, um Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den Proben zu visualisieren. Zudem wurden Pearson-Korrelationskoeffizienten und Variationskoeffizienten (*Coefficient of Variation*, CV) zwischen Proben innerhalb und zwischen verschiedenen Gefäßen und Zeitpunkten berechnet. Die Visualisierungen in Boxplots wurden mit GraphPad Prism (Version 8.0.2, San Diego, Kalifornien, USA) erstellt. Boxplots zeigen den Median (Linie), das 25.–75. Perzentil (Box) sowie die minimalen und maximalen Werte (Whiskers, min–max) der Messungen.

Es wurde ein PP-Replikat bei Hersteller C und m-PP-Replikat bei Hersteller A von der weiteren Analyse ausgeschlossen, da mittels PCA eine starke Abweichung zu den anderen Replikaten festgestellt wurde, die auf eine zu langsame Injektion und zu langes Verbleiben im Glas-Gefäß zurückzuführen ist.

Um signifikant adsorbierte Peptide zu identifizieren, wurde ein Welch's t-Test durchgeführt, bei dem die Peptidabundanzen der Kontrollprobe (0 h) und der 24 Stunden (24 h) inkubierten Probe für alle Oberflächen verglichen wurden. Peptide mit einem p-Wert $\leq 0,05$ und einem \log_2 -Fold-Change ≥ -1 wurden als statistisch signifikant unterschiedlich abundant betrachtet und als adsorbiert klassifiziert. Die t-Test-Ergebnisse wurden in einem Volcano-Plot visualisiert, wobei der $-\log_{10}(p\text{-Wert})$ gegen den \log_2 -Fold-Change geplottet wurde. Volcano-Plots sowie UpSet-Diagramme zur Analyse der Überschneidungen adsorbierten Peptide zwischen verschiedenen Gefäßtypen wurden in der R-Softwareumgebung (Version 4.3.3) unter Nutzung der RStudio IDE (Version 2023.12.1+402, RStudio PBC) erzeugt. Für die Erstellung der UpSet-Diagramme kam das Package UpSetR (Lex et al., 2014) zum Einsatz. Zusätzlich wurde die Anzahl an Peptiden bestimmt, die in allen Replikaten der 0 h-Probe, aber in keiner 24 h-Probe quantifiziert wurden.

5.2.6. Analyse der physikochemischen Eigenschaften adsorbiertter Peptide

Für die Charakterisierung der physikochemischen Eigenschaften der adsorbierten Peptide wurde ein Python-Skript basierend auf dem Package „peptides“ entwickelt, um die Eigenschaften der Peptide hinsichtlich ihrer Länge und Hydrophobizität zu berechnen. Ladungszustände unter +2 wurden in der Analyse vernachlässigt, da diese nicht zur Fragmentierung in der LC-MS-Messung zugelassen wurden. Die Ladung wurde basierend auf dem Vorkommen der Aminosäuren R, K und H berechnet, die bei pH 2,7 protoniert vorliegen sowie dem bei diesem pH-Wert ebenfalls protonierten N-Terminus. Die Ergebnisse wurden anschließend genutzt, um Abbildungen in GraphPad Prism (Version 8.0.2, San Diego, Kalifornien, USA) zu erstellen. Um signifikante Unterschiede zwischen den Peptid-Eigenschaften der adsorbierten und der nicht bindenden Peptide zu erkennen, wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Zur Analyse der Aminosäureverteilung in adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden wurde ein eigenes Skript in der R-Softwareumgebung (Version 4.3.3) unter Nutzung der RStudio IDE (Version 2023.12.1+402, RStudio PBC) entwickelt. Für Peptide mit einer Länge von 15 Aminosäuren berechnete das Skript den Anteil jeder einzelnen Aminosäure am Gesamtpeptid sowie die Differenz der relativen Häufigkeiten zwischen adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden.

5.3. Automatisiertes Python Skript (APS-Assay-Skript)

Zur automatisierten Analyse der quantitativen Peptidabundanzen nach der Datenbanksuche wurde ein APS-Assay-Skript in Python unter Verwendung der Spyder-IDE entwickelt. Als Eingabedatei dient eine Excel-Tabelle mit den Spalten „Peptides“, „Modifications“ sowie den Abundanzspalten, die entsprechend den experimentellen Gruppen, beispielsweise „0 h“,

benannt sind. Das Skript umfasst sämtliche zuvor manuell durchgeführten Verarbeitungsschritte, darunter die \log_2 -Transformation der Abundanzwerte, die Entfernung modifizierter Peptide sowie der jeweils korrespondierenden nicht-modifizierten Version, die Reduktion auf Werte, die in allen Proben vorkommen, sowie die Durchführung statistischer Tests zwischen den definierten Gruppen. Für die statistische Auswertung stehen unter anderem ein Welch's t-Test mit voreingestellten Cut-offs (\log_2 -Fold-Change ≤ -1), die freie Wahl einer p-Wert-Schwelle sowie multiples Testen mit FDR-Korrektur nach Benjamini–Hochberg zur Verfügung. Die Nettoladung der Peptide wurde bei pH 2,7 berechnet, basierend auf der pK-Skala nach Bjellqvist (Bjellqvist et al., 1993) und unter Verwendung der Henderson–Hasselbach-Gleichung für die Ladung einzelner Aminosäurereste, kann jedoch beliebig angepasst werden. Die Berechnungen erfolgten mit dem Python-Paket „peptides“ (Version 0.5.0, <https://peptides.readthedocs.io/en/stable/>). Zusätzlich werden automatisiert der GRAVY-Wert sowie die Medianwerte beider Gruppen berechnet, wobei signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test geprüft werden. Die Ergebnisse werden in vier Diagrammen visualisiert, die einen Volcano-Plot mit den signifikant adsorbierten Peptiden (nach p-Wert oder FDR-korrigiertem t-Test), die Verteilung der Peptidlängen, die Hydrophobizität sowie die Ladungsverteilung (gerundet) darstellen und damit eine unmittelbare Beurteilung der Adsorptionsvorgänge ermöglichen. Das APS-Assay-Skript mit zusätzlichen Erläuterungen zu den implementierten Funktionen und Berechnungen ist im Anhang unter Kapitel 10.2. zu finden.

5.4. Testung von 96-Well-Platten von Hersteller A

Der HeLa-Peptidstandard wurde, wie zuvor beschrieben, auf eine Konzentration von 5 ng/ μ L in 0,1 % FA in Wasser gelöst und anschließend in einem 1,5-mL-Gefäß aus m-PP von Hersteller A gelagert.

Zur Testung von Autosampler-geeigneten 96-Well-Platten von Hersteller A (PP und m-PP) wurden kurz vor der Messung 100 μ L der HeLa-Peptidlösung in einen Hohlraum der 4 Ecken der Platte transferiert und die Messung direkt gestartet. Nach 24 Stunden wurde die Messung nach Inkubation bei 4 °C im Autosampler für 24 Stunden aus der Platte wieder gestartet (n=4).

Die chromatographische Trennung der tryptischen Peptide wurde mit einem Zwei-Puffer-System auf einem UHPLC-System (Vanquish™ neo UHPLC-System, Thermo Fisher) durchgeführt (Puffer A: 0,1 % FA in H₂O, Puffer B: 0,1 % FA in 80 % ACN und 20 % H₂O) bei einer Flussrate von 0,3 μ L/min. Nach dem Laden der Peptide auf eine Vorsäule (Acclaim™ PepMap™ 100 C18 Trap-Säule, 100 Å, 5 μ m, 100 μ m x 20 mm) erfolgte die analytische Trennung über eine 25-cm-C18-Reversed-Phase-Säule (75 μ m x 250 mm, 130 Å Porengröße, 1,7 μ m Partikelgröße, Peptide BEH C18, nanoEase, Waters). Die Peptide wurden mit einer

35-minütigen Methode getrennt, wobei die Puffer-B Konzentration linear über 22 Minuten von 2,5 % auf 37,5 % Puffer B erhöht wurde und dann innerhalb von 3 Minuten auf 55 % Puffer B anstieg. MS/MS-Messungen wurden an einem Quadrupol-Orbitrap-Hybrid-Massenspektrometer (Exploris 480, Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die eluierenden Peptide wurden mittels Nano-Elektrospray-Ionisation (nano-ESI) mit einer Spannung von 1.700 V ionisiert und im *Data-Dependent Acquisition* (DDA)-Modus analysiert. Für jeden MS1-Scan wurden Ionen für 25 ms akkumuliert, mit einem AGC-Ziel von 300 %. Der Scanbereich lag bei m/z 350–1200, mit einer Auflösung von 120.000 bei m/z 200. Innerhalb von Isolationsfenstern von m/z 2 wurden bei einer normalisierten Kollisionsenergie von 30 % unter Verwendung der *Higher-Energy Collisional Dissociation* (HCD) die Top-15 Vorläuferionen mit Ladungszuständen zwischen +2 und +6 und einer minimalen Intensität von 8×10^3 fragmentiert. Eine dynamische Exklusion für bereits fragmentierte Peptide von 30 s wurde gesetzt. MS/MS-Spektren wurden mit einer Auflösung von 15.000 und ab einem Startwert von m/z 120 aufgenommen, mit einem normalisierten AGC-Ziel von 50 % und einer maximalen Injektionszeit von 100 ms.

Die Spektren aus den LC-MS/MS-Messungen wurden mit der Proteome Discoverer-Software (Version 3.1.0.638, Thermo Fisher Scientific, Milford, USA) gegen eine *Homo sapiens*-Datenbank (SwissProt) durchsucht, die im November 2023 mit 20.354 Einträgen heruntergeladen wurde. Als feste Modifikation wurde die Carbamidomethylierung von Cystein-Resten berücksichtigt. Dynamische Modifikationen umfassten die Bildung von Pyroglutamat am N-terminalen Glutamin, Acetylierungen, den Verlust von Methionin, Oxidationen von Methionin und Formylierungen an Serin-, Lysin- und Threonin-Resten. Für die Suche wurde eine maximale Zahl von zwei fehlenden tryptischen Schnittstellen zugelassen und nur Peptide mit einer Länge zwischen 6 und 144 Aminosäuren wurden berücksichtigt. Zur Sicherstellung einer hohen Identifikationssicherheit wurde ein strenger Cut-Off ($FDR < 0,01$) angewendet. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe des in Proteome Discoverer implementierten Minora-Algorithmus.

Die Analyse und Visualisierung erfolgten mit dem APS-Assay-Skript. Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) wurde in Perseus durchgeführt und die Diagramme wurden mit GraphPad Prism (Version 8.0.2, San Diego, USA) erstellt.

5.5. Testung von 1,5-mL-Gefäßen von Hersteller A aus m-PP-Platte

Der HeLa-Peptidstandard wurde, wie zuvor beschrieben, auf eine Konzentration von 5 ng/ μ L in 0,1 % FA in Wasser gelöst und anschließend in einem 1,5-mL-Gefäß aus m-PP von Hersteller A gelagert.

Zur Testung von 1,5-mL-Gefäßen von Hersteller A (PP und m-PP) wurden 120 µL HeLa-Peptide (5 ng/µL) in 1,5-mL-Gefäße aus PP und m-PP von Hersteller A pipettiert und 20 µL direkt in eine 96-Well-Platte von Hersteller A transferiert und bei -20 °C gelagert (0 h Kontrolle). Die verbliebenen 100 µL wurden für 24 h bei RT inkubiert und anschließend in die 96-Well-Platte übertragen und bis zur Messung bei -20 °C gelagert.

Vor der Messung wurden die Proben aufgetaut bei RT und in den Autosampler eines UHPLC-Systems (Vanquish™ neo UHPLC-System, Thermo Fisher) gestellt. Die Messung erfolgte, wie in Kapitel 5.4. beschrieben auf einem Quadrupol-Orbitrap-Hybrid-Massenspektrometer (Exploris 480, Thermo Fisher Scientific) mit leicht veränderten Einstellungen. Die Peptide wurden mit einer 80-minütigen Methode getrennt, wobei die Puffer-B Konzentration linear über 70 Minuten von 2,5 % auf 37,5 % Puffer B erhöht wurde. Anschließend erfolgte ein Anstieg auf 99 % über 10 Minuten, gefolgt von einer Re-Equilibrierung der Säule. Die eluierenden Peptide wurden mittels Nano-Elektrospray-Ionisation (nano-ESI) mit einer Spannung von 1.800 V ionisiert und im *Data-Dependent Acquisition* (DDA)-Modus analysiert (Top-20 Vorläuferionen). Der Scancbereich lag bei m/z 350–1400, mit einer Auflösung von 60.000 bei m/z 200.

Die Spektren aus den LC-MS/MS-Messungen wurden mit der Proteome Discoverer-Software (Version 3.1.0.638, Thermo Fisher Scientific, Milford, USA) gegen eine *Homo sapiens*-Datenbank (SwissProt) durchsucht, die im November 2023 mit 20.354 Einträgen heruntergeladen wurde und wie in 5.4. beschrieben, analysiert.

5.6. Proteinquantifizierung und Analyse

Zur Analyse der Auswirkung auf die quantitative Bottom-up-Proteomanalytik wurden die Ergebnisse der 1,5-mL-Gefäße von Hersteller A nach Optimierung genutzt. Die Abundanzen der in allen Proben quantifizierten Peptide wurden zunächst nach ihrem Ursprungsprotein zusammengefasst. Dabei wurden nur Proteine berücksichtigt, für die mindestens zwei eindeutige (*unique*) Peptide vorlagen. Die Summierung der Peptidabundanzen erfolgte mithilfe der Konsolidierungsfunktion in Microsoft Excel und die resultierenden Proteinabundanzen wurden \log_2 -transformiert. Für jedes Setup wurde ein Welch's t-Test zwischen der Kontrollprobe (0 h) und den 24 h inkubierten Proben durchgeführt. Proteine mit einem p-Wert < 0,05 und einem \log_2 -Fold-Change $\leq -0,58$, wurden als signifikant unterschiedlich abundant definiert. Die Testergebnisse wurden in Form eines Volcano-Plots visualisiert, wobei der $-\log_{10}(p\text{-Wert})$ gegen den \log_2 -Fold-Change aufgetragen wurde. Die Visualisierung erfolgte mit einem Inhouse-Skript in der R-Software-Umgebung.

Zur funktionellen Charakterisierung wurde eine Gen-Set-Enrichment-Analyse (GSEA) mit dem clusterProfiler-Package (Xu et al., 2024) in R durchgeführt. Dabei wurde die Funktion gseKEGG, basierend auf der KEGG-Datenbank (Kanehisa & Goto, 2000) verwendet (*organism* = hsa, *keyType* = uniprot, *exponent* = 1, *minGSSize* = 10, *maxGSSize* = 500, *eps* = 1×10^{-10} , *pvalueCutoff* = 0,1, *pAdjustMethod* = BH, *by* = fgsea) HeatMaps wurden in R (R Core Team, 2022) visualisiert.

5.7. LC-Tandem-Quadrupol-MS-Messungen von synthetischen Peptiden

5.7.1. Herstellung der Peptidstammlösungen

Synthetische Peptide mit den Sequenzen SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK (hydrophob) und DGETPDPEDPSRK (hydrophil) (LifeTein, LLC, Hillsborough, New Jersey, USA) wurden auf 2500 μ M in Wasser (LC-MS Qualität) in einem 1,5-mL-Gefäß aus m-PP von Hersteller A verdünnt und als Aliquots von 20 μ L (Stammlösung) bei -20 °C gelagert.

Die Peptid-Stammlösungen der Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-markierten Peptide wurde durch Lösen des Peptid-Lyophilisats in Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung (DPBS) auf eine Konzentration von 250 μ M hergestellt. Die Peptidlösungen wurden anschließend in Aliquots von jeweils 20 μ L in 1,5-mL-m-PP-Gefäße von Hersteller A abgefüllt und lichtgeschützt bei -20 °C gelagert. Die Vorbereitung wurde bei der Eppendorf SE durchgeführt.

5.7.2. Vorbereitung der Proben zur Adsorptionsbestimmung

Vor der Messung wurden die Aliquots in den zu untersuchenden Puffern – 0,1 % Ameisensäure in Wasser, 50 % Acetonitril/Wasser (v/v) oder reinem Wasser – auf eine Arbeitskonzentration von 250 nM verdünnt. Sechs Replikate der Bedingungen „keine Inkubation“ (0 h) und „inkubiert“ (24 h) wurden vorbereitet, indem jeweils 150 μ L der Probenlösung in 1,5-mL-Gefäße aus PP und m-PP von Hersteller A pipettiert wurden. 50 μ L der Probe wurden direkt in eine 96-Well-m-PP-Platte von Hersteller A überführt und bei -80 °C eingefroren. Nach Inkubation für 24 Stunden bei Raumtemperatur wurden weitere 50 μ L in die 96-Well-m-PP-Platte übertragen. Bis zur Messung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

5.7.3. Probenvorbereitung zum Vergleich mit FITC-markierten Peptiden

Proben mit FITC-markierten Peptiden wurden von der Eppendorf SE hergestellt. Die Stammlösungen wurden in 0,1 % FA oder DPBS (pH 7,2) auf eine Endkonzentration von 250 nM eingestellt und in 1,5-mL-Gefäßen von Hersteller A in Triplikaten angesetzt.

Die nicht markierten Peptide wurden unter denselben Bedingungen in 0,1 % FA oder DPBS auf 250 nM verdünnt und ebenfalls in 1,5-mL-Gefäßen von Hersteller A in Triplikaten vorbereitet.

174 μ L der jeweiligen Lösungen (Konzentration: 250 nM) wurden in 1,5-mL-Gefäßen aus PP und m-PP von Hersteller A pipettiert und sofort bei -80°C eingefroren oder 24 h bei RT inkubiert und anschließend bei -80 °C eingefroren. Kurz vor der Messung wurden die Proben in eine 96-Well-Mikrotiterplatte aus m-PP von Hersteller A überführt.

5.7.4. Probenvorbereitung für synthetische Peptid-Kinetik

Die hydrophobe Peptid-Stammlösung wurde auf eine Konzentration von 250 nM in Wasser, 0,1 % FA oder 0,02 % n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) in m-PP-Gefäßen von Hersteller A verdünnt und 174 μ L wurden in Autosampler-Gefäße aus PP und G von Hersteller E pipettiert. Die Injektion von 2 μ L über *Flow-Injection-Analyse* (FIA) in das TQ-MS-System wurde direkt nach dem Probenübertrag und alle 30 Minuten über 11,5 Stunden durchgeführt (24 Injektionen).

5.7.5. MRM-Messungen zur Quantifizierung

Die Messung der synthetischen Peptide erfolgte auf einem Ultivo Tandem-Quadrupol (TQ)-MS (Agilent), das an eine 1290 Infinity II UHPLC (Agilent) gekoppelt war. Es wurde ein Zwei-Puffer-System verwendet, bestehend aus 0,1 % FA in Wasser (Puffer A) und 0,1 % FA in ACN (Puffer B).

Alle Messungen, außer der Vergleich der unmarkierten zu FITC-markierten Peptide, wurden mittels Flow-Injection-Analyse (FIA) ohne chromatographische Trennung durchgeführt bei 50 % Puffer B und einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL/min. Die Platte wurde in die Autosampler-Einheit eingesetzt und pro Probe wurden 2 μ L Volumen vom Autosampler injiziert.

Da zum Vergleich mit den FITC-markierten Peptiden DPBS als Lösungsmittel verwendet wurde, wurde eine chromatographische on-line-Aufreinigung gewählt, um die Probe zu entsalzen. Dazu wurde eine 5 cm-lange C18-Säule (InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 HPLC-Säule, 120 Å, 1,9 μ m, 2,1 x 50 mm, Agilent) verwendet. Die Methode umfasste 8 Minuten mit einer Flussrate von 0,5 mL/min, wobei mit 10 % Buffer B gestartet wurde und in 4,5 min linear auf 60 % B erhöht wurde mit anschließender Äquilibrierungsphase. Für die MRM-Messungen wurden die in Tabelle 9 aufgeführten Parameter eingestellt.

Tabelle 9: Instrumentenparameter für die MRM-Messungen auf dem Agilent Ultivo TQ.

Parameter	Wert
Kapillarspannung	4000 V
Nozzle-Spannung	1500 V
Gas-Temperatur	300 °C
Gasfluss	8,0 L/min
Nebulizer-Druck	35 psi
Sheath-Gas-Temperatur	300 °C
Sheath-Gas-Fluss	11,0 L/min

Die MRM-Übergänge der Peptide wurden in der Agilent MassHunter Workstation mit dem Mass Hunter Optimizer (Agilent) bestimmt. Zunächst wurden die Vorläuferionen anhand ihrer erwarteten m/z-Werte identifiziert und der intensivste Vorläufer für die MRM-Methodenerstellung ausgewählt. Anschließend erfolgte eine Fragmentierung im Produkt-Ion-Scan, um die charakteristischen Fragmentionen zu detektieren. Das Fragmention mit der höchsten und stabil reproduzierbaren Signalintensität wurde als *Quantifier* ausgewählt und zur quantitativen Bestimmung verwendet, während zwei weitere markante Fragmente als *Qualifier* dienten, um die Identität der Peptide zu bestätigen und Interferenzen auszuschließen. Die Kollisionsenergien für jeden Übergang wurden mithilfe der automatischen CE-Optimierung in MassHunter ermittelt, um die Signalintensität zu maximieren. Die Quadrupol-Auflösung war auf „Unit“ (FWHM = 0,7 Da) eingestellt. Die Dwell-Time betrug 100 ms und wurde für alle überwachten Übergänge konstant gehalten. Die MRM-Übergänge für die analysierten Peptide sowie die dazugehörigen Kollisionsenergien sind in Tabelle 10 zusammengefasst:

Tabelle 10: Fragmentor-Spannung, MRM-Übergänge der Vorläuferionen (Quantifier und Qualifier) und Kollisionsenergien (CE).

Peptid	Frag-mentor (V)	Quantifier (m/z)	Qualifier 1 (m/z)	Qualifier 2 (m/z)	CE (V)
Hydrophob	140	754,2 → 86,2	754,2 → 173	754,2 → 71,9	45, 45, 45
Hydrophil	114	481,6 → 69,9	481,6 → 101,9	481,6 → 83,9	60, 28, 60
Hydrophob-FITC	142	921,6 → 390,1	921,6 → 86,5	921,6 → 69,8	60, 60, 60
Hydrophil-FITC	160	649 → 390	649 → 74	649 → 69,8	48, 32, 60

Für die quantitative Analyse der synthetischen Peptide SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK und DGETPDPEDPSRK wurden jeweils stabile, niedrigmolekulare Fragmentionen ausgewählt. Diese Fragmente zeigten unter den bestimmten Kollisionsbedingungen höhere Intensitäten

als die klassischen b- und y-Ionen, was auf sequenzabhängige Fragmentierungspräferenzen zurückzuführen ist (Falick et al., 1993). Beim ersten Peptid wurden die Fragmente mit m/z 86,2 (Leu/Ile-Immonium-Ion), 173,0 (Gly-Asp) und 71,9 (Val-Immonium-Ion), beim zweiten Peptid die Fragmente mit m/z 69,9 (Pro-Immonium-Ion), 83,9 (Lys-Immonium-Ion) und 101,9 (Glu-Immonium-Ion) gemessen. Für die FITC-markierten Peptide wurde jeweils das FITC-Immonium-Ion als Quantifier verwendet. Die Qualifier lagen bei m/z 86,5 (Leu/Ile-Immonium-Ion) und 69,8 (Ala-Immonium-Ion). Beim Hydrophil-FITC-Peptid lagen die Qualifier bei m/z 74 (Val-Immonium-Ion) und 69,8 (Ala-Immonium-Ion).

Die Peak-Erkennung, Integration und quantitative Analyse wurde mit der Software MassHunter Quantitative Analysis for QQQ (Version 10.0, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) durchgeführt. Die Peak-Integration erfolgte anhand des Agile2-Integrators.

Zur Überprüfung der Linearität wurde eine Kalibriergerade mit Standardlösungen im Bereich von 10 bis 1000 ng/µL über drei Replikate erstellt. Die grafische Darstellung der MRM-Experimente sowie die Durchführung der linearen Regression mit Berechnung des Korrelationskoeffizienten (R^2) erfolgten mit GraphPad Prism (Version 8.0.2, GraphPad Software, San Diego, USA). Auch die Auswertung der Inkubationsexperimente erfolgte in GraphPad Prism mittels Welch's t-Tests.

5.8. Bestimmung der Peptidsekundärstruktur

5.8.1. Strukturvorhersage mit AlphaFold 3

Zur Analyse der Sekundärstruktur wurde AlphaFold 3 verwendet (Abramson et al., 2024). Die Hydrophobizität wurde anschließend in UCSF ChimeraX (Meng et al., 2023) visualisiert. Dabei wurden zwei Methoden zur Markierung nach Hydrophobizität genutzt: Zum einen nach der Hydropathie-Skala von Kyte und Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982) und zum anderen unter Verwendung des molekularen Lipophilizitäts-Potentials (*molecular lipophilicity potential*, MLP), das auf dem Programm pyMLP basiert (Broto et al., 1984; Laguerre et al., 1997), wobei anstelle der ursprünglichen atomaren Lipophilizitätswerte die Werte aus der Arbeit von Ghose et al. verwendet wurden (Ghose et al., 1998).

5.8.2. Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Zur Sekundärstrukturanalyse mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD) wurde das hydrophobe Peptid in einer Konzentration von 50 µM in Wasser oder 50 % ACN, 0,1 % FA in Wasser gelöst. Zusätzlich wurde das Peptid in Wasser mit 40 % Trifluoroethanol (TFE) gelöst und vor der Messung für 15 Minuten inkubiert. Die Peptidproben wurden anschließend in einer Quarz-Küvette (400 µL, 1 mm Strahlungsweg, Hellma, Müllheim, Deutschland) wie zuvor beschrieben (Draper-Barr et al., 2025) bei 180–260 nm mit einem ChiraScan Circular

Dichroism Spektrophotometer (Applied Photophysics, Leatherhead, UK) gemessen, das mit einem Quantum Northwest TC 125 Temperaturcontroller (Liberty Lake, Washington, USA) auf 21 °C eingestellt war. Für jedes Spektrum wurden drei Replikate aufgenommen, jeweils mit einer Schrittweite von 1 nm und einer Reaktionszeit von 1 s.

Die effektiven Peptidkonzentrationen wurden über die pufferkorrigierte UV-Absorption bei 214 nm unter Verwendung des über das *BestSel*-Tool berechneten Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 29\,392\,M^{-1}\,cm^{-1}$ (Kuipers & Gruppen, 2007) nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bestimmt (Kardos et al., 2025), wobei l die Pfadlänge und A die pufferkorrigierte Absorption war.

$$c = \frac{\epsilon \cdot l}{A}$$

Alle CD-Messdaten wurden pufferkorrigiert und in den *Mean Residue Ellipticity* (MRE, $[\Theta]$) umgerechnet, um Unterschiede der Anzahl von Peptidbindungen und Konzentration auszugleichen:

$$[\Theta] = \frac{\Theta}{10 \cdot c_r \cdot l}$$

Wobei Θ die mittels CD gemessene Elliptizität ist, c_r die molare Konzentration pro Aminosäure und l der Strahlungsweg sind. Anschließend wurde daraus $\Delta\epsilon$ berechnet (Micsonai et al., 2021):

$$\Delta\epsilon = [\Theta]/3298.2$$

Die Sekundärstrukturanteile der Peptide wurde mittels *BestSel* (Kardos et al., 2025) oder über das ChiraKit-Tool (Burastero et al., 2025) des SPC-Online-Portals (<https://spc.embl-hamburg.de/app/chirakit>) über die Algorithmen *Selcon* (2 bzw. 3) (Sreerama et al., 2000) oder *Peptide Helicity* (Zavrtanik et al., 2024) berechnet.

Zur Bestimmung der thermischen Stabilität wurden Schmelzkurven von 5–95 °C bei Temperaturerhöhung von 1 °C/min gemessen, wobei die CD-Signale in 5 °C-Schritten gemessen wurden. Die Schmelztemperatur der Peptide über das ChiraKit-Tool (Burastero et al., 2025) des SPC-Online-Portals (<https://spc.embl-hamburg.de/app/chirakit>) bestimmt.

5.8.3. Bestimmung des Aggregationspotentials

Zur Identifikation potenziell aggregationsanfälliger Bereiche innerhalb der Peptidsequenz wurde die Online-Software AGGRESCAN (<http://bioinf.uab.es/aggrescan/>) verwendet (Conchillo-Solé et al., 2007). Die Peptidsequenz wurde als Input eingegeben und die

Standardparameter des Tools genutzt, einschließlich des Schwellenwertes HAST für die Aggregationsneigung. Hotspots wurden als Bereiche mit mindestens fünf aufeinanderfolgenden Aminosäuren mit Aggregationswerten (a4v) über dem Schwellenwert definiert, wobei Prolinpositionen als Unterbrechungen ausgeschlossen wurden. Die Ergebnisse wurden als Hot-Spot-Bereich (HSA) über die gesamte Peptidlänge geplottet und mit Referenzpeptiden verglichen.

5.9. Einsatz KI-gestützter Tools

Zur sprachlichen Überarbeitung einzelner Textpassagen sowie zur Unterstützung bei der Fehlersuche während der Entwicklung des Python-basierten APS-Assay-Skripts wurde das KI-gestützte Sprachmodell ChatGPT (GPT-4o, OpenAI, 2025) eingesetzt. Die inhaltliche Gestaltung, Interpretation der Ergebnisse sowie alle wissenschaftlichen Entscheidungen wurden eigenständig von der Autorin getroffen. Die Nutzung erfolgte im Einklang mit den Grundsätzen Guter Wissenschaftlicher Praxis.

5.10. Datenbereitstellung

Die massenspektrometrischen Proteomdaten der APS-Assay-Entwicklung (PP- und m-PP-Gefäße von Hersteller A, B, C sowie G- und m-G-Gefäße von Hersteller D) sind über das ProteomeXchange-Konsortium (Perez-Riverol et al., 2022) (PRIDE-Partner-Repository) mit der Datensatzkennung PXD044268 abgelegt.

Die massenspektrometrischen Proteomdaten der APS-Assay-Optimierung (PP und m-PP, PP- und m-PP-Platten von Hersteller A), alle APS-Assay-Ergebnisse und das APS-Assay-Skript sind über das Forschungsdatenrepository (FDR) der Universität Hamburg zugänglich (DOI: 10.25592/uhhfdm.18057)

6. Ergebnisse

6.1. Entwicklung des APS-Assays

Im Folgenden soll die Entwicklung des Assays zur Bestimmung der „Adsorption-Properties-of-Surfaces“ (deutsch: „Adsorptionseigenschaften von Oberflächen“) beschrieben werden, kurz APS. Im Rahmen der Entwicklung des APS-Assays wurde eines der am häufigsten in molekularbiologischen Laboren genutzten Gefäße ausgewählt, Probengefäß mit Schnappverschluss. Die Gefäße werden aus Polypropylen (PP) gefertigt und finden Anwendung bei der Lagerung von Proben sowie der nachfolgenden Verarbeitung zu analytischen Messzwecken. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden Gefäße der Standardgröße mit einem Füllvolumen von 1,5 mL von drei verschiedenen Herstellern (Hersteller A, B und C) ausgewählt, um die Adsorptionseigenschaften der Gefäßtypen Polypropylen (PP) und „modifiziertes“ Polypropylen (m-PP) mit zugeschriebenen „Protein-Low-Binding“-Eigenschaften zu evaluieren. Zusätzlich wurden Glasvials für Autosampler von Flüssigkeitschromatographieanlagen aus Glas und „modifiziertem“ Glas (G und m-G von Hersteller D) mit „Low-Retention“-Eigenschaften berücksichtigt, die insbesondere in der massenspektrometrischen Analytik zum Einsatz kommen. Als Lösungsmittel diente 0,1 % Ameisensäure (FA) in Wasser mit einem pH-Wert von 2,7.

Teile der im Folgenden vorgestellten Ergebnisse zur Entwicklung des APS-Assays wurden bereits publiziert (Siebels et al., 2024).

6.1.1. Überprüfung der benetzten Fläche

Die Adsorption von Molekülen hängt maßgeblich von der Größe der Oberfläche, die zur potenziellen Interaktion mit den Analyten zur Verfügung steht, ab. Daher wurde die benetzte Innenoberfläche von 1,5-mL-PP-Gefäßen der drei verschiedenen Hersteller bei einem Füllvolumen von 100 µL (100 mm³) mithilfe von Computertomographie vermessen. Die gemittelten Werte der Doppelbestimmung sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Benetzte Oberfläche von PP- und m-PP-Gefäßen bei identischem Probenvolumen. Die benetzte Fläche wurde mittels CT-Messung in Duplikaten bestimmt und in mm² Fläche bei Füllung mit 100 µL Volumen berechnet.

Gefäß	Volumen [mm ³]	Benetzte Fläche [mm ²]
PP Hersteller A	99,986	97,523
m-PP Hersteller A	100,000	98,318
PP Hersteller B	100,023	100,780
m-PP Hersteller B	100,010	99,860
PP Hersteller C	99,995	97,918
m-PP Hersteller C	100,025	97,900

Bei einem eingesetzten Volumen von 100 mm³ mit einer Standardabweichung von 0,016 mm³, betrug die gemessene benetzte Fläche im Durchschnitt über alle Gefäße 98,72 mm² bei einer Standardabweichung von 1,30 mm². Aufgrund dieser geringen Abweichungen der benetzten Fläche ist ein direkter Vergleich der Gefäße bei einer Füllmenge von 100 µL möglich und wurde bei der weiteren Auswertung nicht einbezogen.

Für die Glasgefäße wurde eine solche Messung nicht durchgeführt, da beide Gefäße vom selben Hersteller (D) stammen, die Grundform des Gefäßes sich grundlegend von denen der 1,5-mL-Gefäße unterscheiden und im Folgenden die Adsorption an PP und G nicht direkt miteinander verglichen wurden.

6.1.2. Analytenwahl

Für die Entwicklung und Validierung des APS-Assays wurde ein kommerziell erhältliches, tryptisches Peptid-Referenzgemisch aus HeLa-Zellen als Analytenmischung eingesetzt. Dieses Standardgemisch findet in der massenspektrometrischen Proteomanalytik Anwendung und dient der Qualitätsprüfung. Das Peptidgemisch enthält eine Vielzahl von Peptiden, die sich in Bezug auf physikochemische Eigenschaften wie Peptidlänge, Ladungsverteilung, Hydrophobizität und Aminosäurezusammensetzung unterscheiden und somit als Sonden zur Ermittlung der Wechselwirkungen dienen.

Durch den Einsatz dieses Standards konnte eine Erfassung einer großen Bandbreite möglicher Peptid-Oberflächen-Wechselwirkungen sichergestellt werden. Dies ist von entscheidender Relevanz, um die Differenzierungsfähigkeit des APS-Assays in Bezug auf unterschiedliche Gefäßoberflächen zuverlässig evaluieren zu können.

6.1.3. Entwicklung des Versuchsaufbau

Zur Durchführung des APS-Assays wurde eine HeLa-Peptid-Stocklösung mit einer Konzentration von 0,25 µg/µL verwendet. Um eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch frühzeitige Adsorption der Peptide an Gefäßwände während der Handhabung zu minimieren, erfolgte die Verdünnung dieser Stammlösung erst unmittelbar vor Beginn des Tests – und zwar direkt im zu testenden Gefäß.

Die finale APS-Testlösung bestand aus Peptiden in einer Konzentration von 5 ng/µL in 0,1 % FA in Wasser. Die gewählte Peptidkonzentration repräsentiert einen möglichst niedrigen, jedoch mittels LC-MS/MS analytisch noch detektierbaren Wert, mit dem Ziel, kompetitive Verdrängungseffekte zwischen den Peptiden sowie sekundäre Adsorptionseffekte, die Bindung von Peptiden an bereits adsorbierte Peptide, zu minimieren.

Da die verwendeten 1,5-mL-Gefäße nicht direkt mit dem Autosampler kompatibel sind, wurde unmittelbar nach Herstellung der Verdünnung eine aliquote Menge von 10 µL aus dem jeweiligen Testgefäß in ein Glasgefäß für den Autosampler überführt. Die LC-MS/MS-Messung erfolgte daraufhin ohne Verzögerung. Die Zeitspanne zwischen Verdünnung und Injektion betrug dabei maximal eine Minute und wurde für alle Proben konstant eingehalten.

Im Anschluss an die erste Injektion verblieb die restliche Lösung für 24 Stunden bei Raumtemperatur (RT) im jeweiligen Testgefäß zur Inkubation. Der gewählte Inkubationszeitraums dient der Annäherung an das thermodynamische Äquilibrium und stellt gleichzeitig eine in der Bottom-up-Proteomik übliche Kontaktzeit bei der Probenvorbereitung dar.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden erneut 10 µL in ein frisches Glasgefäß überführt und mittels LC-MS/MS analysiert. Abbildung 6 veranschaulicht diesen Ablauf schematisch für drei verschiedene Hersteller (A, B, C).

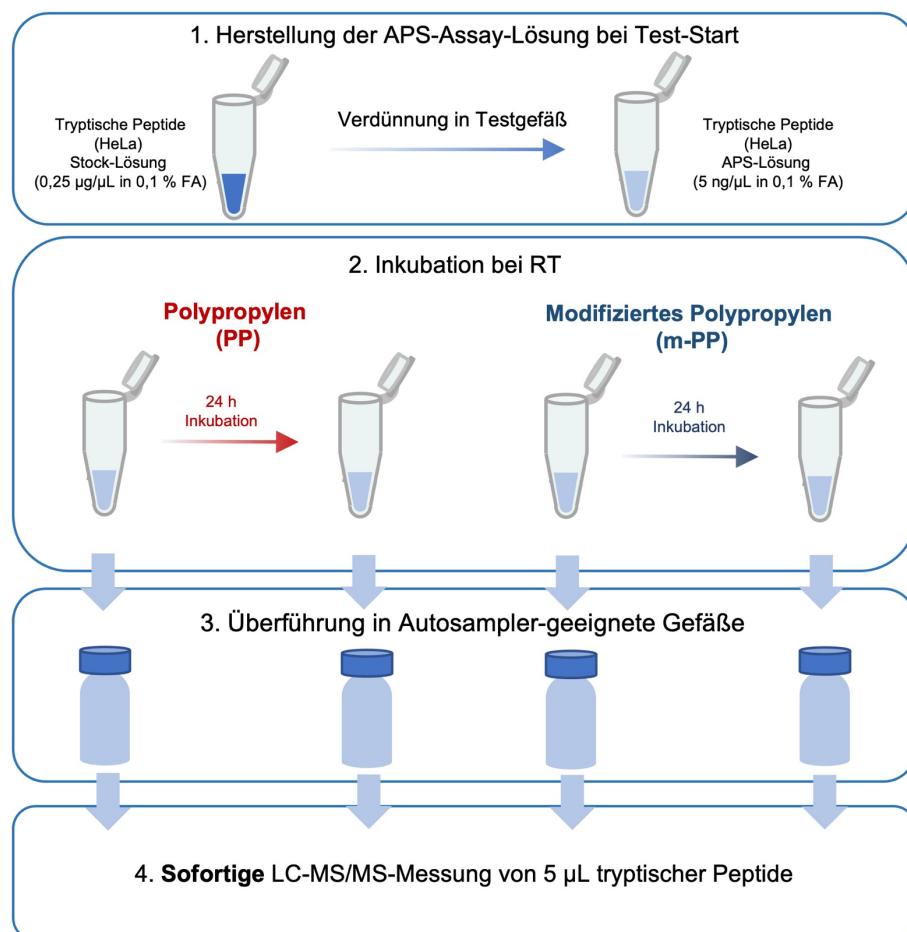


Abbildung 6: Schematische Darstellung des APS-Assays für Gefäße von Hersteller A, B und C. Direkt nach Herstellung der APS-Testlösung (5 ng/µL Peptide in 0,1 % FA in Wasser) im zu untersuchenden Gefäß wurden 10 µL entnommen, in ein Autosampler-geeignetes Gefäß (Glas, Hersteller D) überführt und unmittelbar per LC-MS/MS injiziert (0 h). Anschließend verblieb die restliche Lösung 24 h im Gefäß zur Inkubation. Danach erfolgte erneut eine Injektion von 10 µL (24 h), um die Peptidadsorption quantitativ zu erfassen.

Im Gegensatz zu den getesteten Polypropylen-Gefäßen sind die Glasgefäße direkt mit dem Autosampler kompatibel. Der Versuchsaufbau unterschied sich daher insofern, als dass die Verdünnung der HeLa-Peptidlösung direkt im jeweiligen Glasgefäß erfolgte sowie ein Transferschritt entfiel. Die nachfolgende Inkubation wurde bei einer Temperatur von 4 °C im Autosampler durchgeführt. Diese Temperatur entspricht den typischen Einsatzbedingungen der Proteomanalytik, bei denen Proben über mehrere Stunden bis zur Injektion im Autosampler verbleiben. Der vereinfachte Versuchsablauf für Autosampler-geeignete Gefäße ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

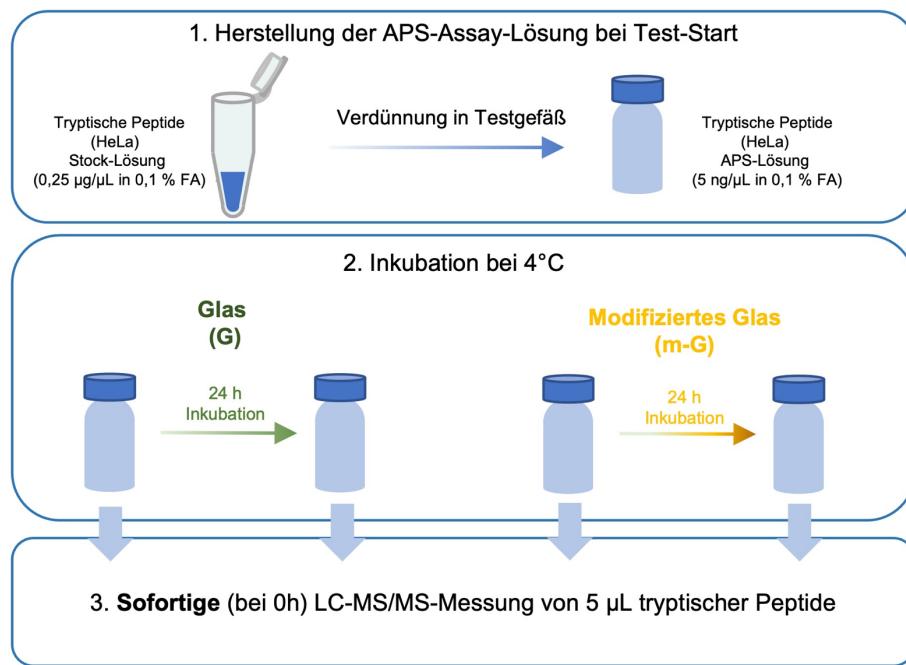


Abbildung 7: Schematische Darstellung des APS-Assays für Gefäße von Hersteller D. Direkt nach Herstellung der APS-Testlösung (5 ng/µL Peptide in 0,1 % FA in Wasser) im zu untersuchenden Gefäß wurden 5 µL per LC-MS/MS injiziert (0 h). Anschließend verblieb die restliche Lösung 24 h im Gefäß zur Inkubation bei 4°C im Autosampler, bevor die erneute Messung (24 h) stattfand.

6.1.4. Datenkuration

Zunächst wurde eine Analyse von Peptidmodifikationen durchgeführt, die infolge der Inkubation in 0,1 % FA in Wasser sowie durch weitere chemische Prozesse entstehen können und im Rahmen massenspektrometrischer Analysen häufig auftreten.

In einer typischen Datenbanksuche gegen eine *in silico*-generierte Peptidsequenzdatenbank werden nur solche Peptide identifiziert, deren Masse und Fragmentierungsmuster exakt mit den theoretischen Werten übereinstimmen. Peptide, die chemisch modifiziert sind und daher eine veränderte Masse aufweisen, werden ohne explizite Berücksichtigung dieser Modifikationen in der Datenbanksuche nicht erkannt. Dies kann fälschlicherweise den Eindruck erwecken, dass diese Peptide adsorbiert worden seien. Um solche

Fehlinterpretationen zu vermeiden, müssen relevante Modifikationen, wie Oxidation, Formylierung oder Pyroglutamatbildung manuell als Suchparameter ergänzt werden.

Ziel war daher, den Anteil an Peptiden zu bestimmen, die vor bzw. nach 24-stündiger Inkubation in einem PP-Gefäß (Hersteller A) entsprechende Modifikationen aufweisen. Abbildung 8 zeigt eine hierarchische Clusteranalyse (basierend auf der Pearson-Korrelation) der Peptidabundanzen vor (0 h) und nach (24 h) Inkubation. In die Analyse wurden ausschließlich Peptide mit signifikant veränderten Abundanzen (p -Wert $< 0,05$) einbezogen.

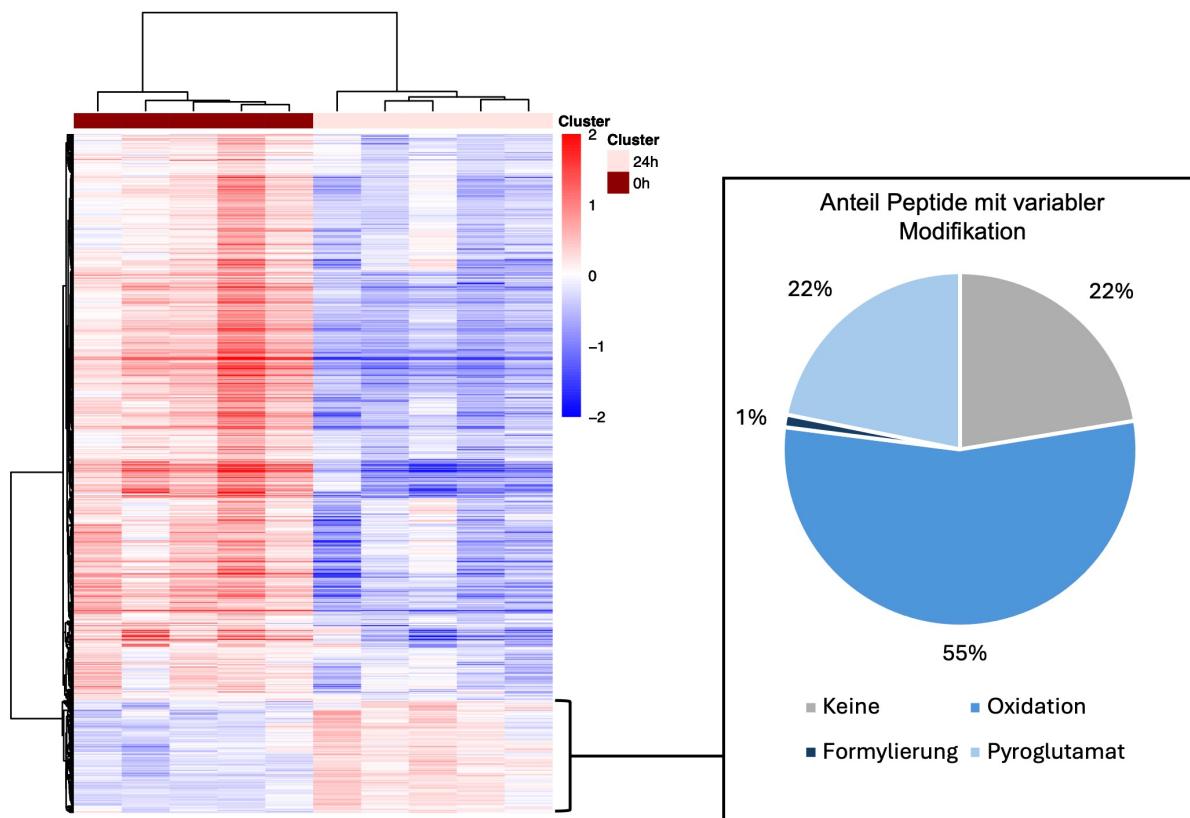


Abbildung 8: Modifikationen von Peptiden infolge der Inkubation in 0,1 % Ameisensäure. Dargestellt ist eine Heatmap-Visualisierung auf Basis von zeilenweise Mittelwert-normalisierten Peptidabundanzen. Die hierarchische Clusteranalyse basierte auf der Pearson-Korrelation und zeigt die Peptidabundanzen vor (0 h) und nach (24 h) Inkubation. In die Analyse wurden ausschließlich Peptide mit signifikant veränderten Abundanzen (p -Wert $< 0,05$) einbezogen. Das Cluster der höher abundanten Peptide wurde auf das Vorkommen von variablen Modifikationen untersucht und ist als Tortendiagramm dargestellt.

Wie auf der rechten Seite der Abbildung ersichtlich, zeigte ein Teil der Peptide nach der Inkubation eine erhöhte Intensität. Von diesen konnten 55 % als oxidiert, 22 % als pyroglutaminiert und 1 % als formyliert identifiziert werden. Bei weiteren 22 % der signifikant angestiegenen Peptide ließ sich keine der betrachteten Modifikationen nachweisen. Um Fehlinterpretationen aufgrund modifizierter Peptide in den folgenden Analysen zu vermeiden,

wurden deshalb alle oxidierten, formylierten und pyro-glutamylierten Peptide aus der Analyse entfernt, sowie auch ihr nicht-modifiziertes Peptid-Pendant.

Die Rohdaten wurden vor der Analyse \log_2 -transformiert, um die Verteilung der Peptidabundanzen zu symmetrisieren und näherungsweise Normalverteilungen zu erreichen. Dies verbessert die Voraussetzungen für nachfolgende statistische Auswertungen. In der Proteomik ist es darüber hinaus üblich, die aus der Datenbanksuche resultierenden Rohabundanzen der Proteine pro Probe zu normalisieren, um technische Schwankungen, etwa durch Probenvorbereitung oder Injektionsunterschiede auszugleichen (Callister et al., 2006). Gängige Verfahren sind die Spalten-Median-Normalisierung, die Gesamtintensitäts-Normalisierung oder die Bezugnahme auf ein internes Referenzprotein. Diese Methoden setzen voraus, dass die Gesamtprotein- bzw. Gesamtpeptidmenge zwischen den Proben vergleichbar ist (O'Rourke et al., 2019; Välikangas et al., 2018).

Die vorliegende Analyse zeigt jedoch eine starke, systematische Abundanzreduktion von Peptiden nach Inkubation, wodurch die Abundanzen einzelner Peptide in bestimmten Proben deutlich reduziert sind. Eine Normalisierung, insbesondere mittels Spalten-Median, würde in diesem Fall die relativen Abundanzen zwischen den Proben verfälschen. In Abbildung 9 ist dies exemplarisch dargestellt.

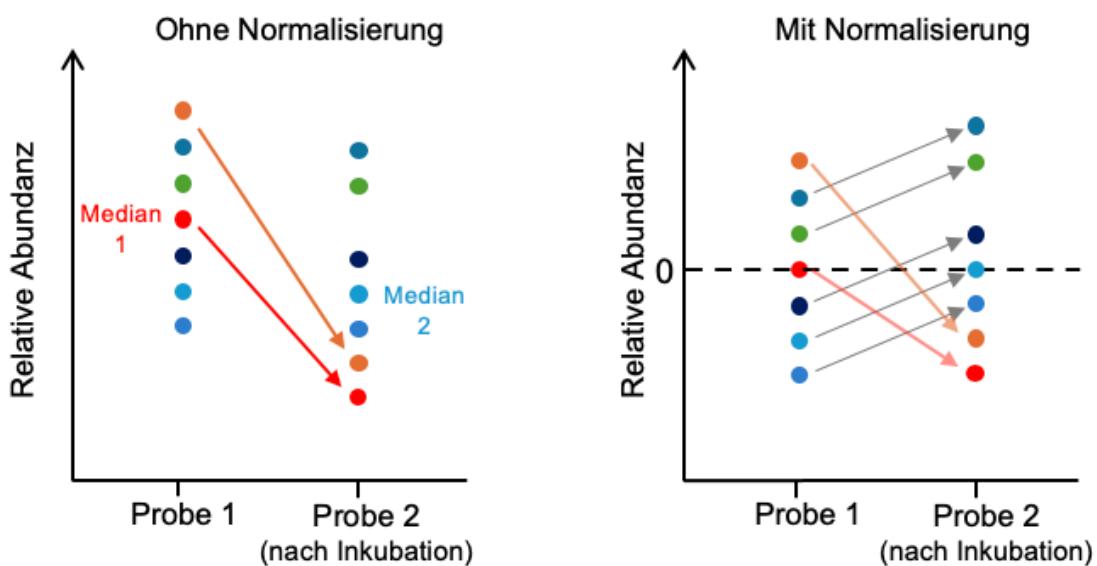


Abbildung 9: Schematische Darstellung der durch Normalisierung hervorgerufenen Datenverzerrung. Links ist die Abundanzveränderung einzelner Peptide (als Punkte dargestellt) gezeigt, wo der Median sich verschiebt, wenn rot adsorbiert wird. Rechts ist die Reduktion der Peptidabundanz nach Median-Normalisierung dargestellt, die zur Folge hat, dass nicht adsorbierte Peptide (z.B. Punkte blau und grün in der inkubierten Probe) höher abundant sind.

In Abbildung 9 ist zu sehen, wie die Abundanzen der Peptide orange und rot in Probe 2 sinken. Dadurch verschiebt sich der Median von rot (Median 1) auf türkis (Median 2). Eine Normalisierung auf diesen neuen Median würde die Werte aller Peptide in dieser Probe

künstlich erhöhen, was zu einer systematischen Überschätzung der Abundanzen und einer Unterschätzung des tatsächlichen Adsorptionseffekts führen würde. Um eine solche Verzerrung zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Analyse auf eine Normalisierung verzichtet.

Für alle folgenden Analysen wurde der um Modifikationen bereinigte Datensatz auf solche Peptide reduziert, die in allen Proben (0 h bzw. 24 h und Gefäßtypen der Hersteller A–D) quantifiziert wurden. Dies führte zu einem Datensatz von insgesamt 3.531 Peptiden, sodass die Vergleiche der Gefäße auf demselben Pool an Peptiden durchgeführt werden konnten. Eine vollständige Liste aller Peptide mit quantitativen Werten ist im öffentlichen Repositoryn verfügbar (Tabelle S1, X).

Zunächst wurde die Reproduzierbarkeit der technischen Replikate jedes Gefäßes eingehend untersucht, um die Konsistenz und Zuverlässigkeit der Messungen zu beurteilen. Dazu wurden die Variationskoeffizienten (CV) berechnet, wobei der höchste durchschnittliche CV bei 3,23 % liegt. Dieser niedrige Wert weist auf eine hohe Reproduzierbarkeit der Peptidquantifizierung hin und unterstreicht, dass die Messungen auch bei wiederholten Experimenten überaus stabil und verlässlich sind (Abbildung 10).

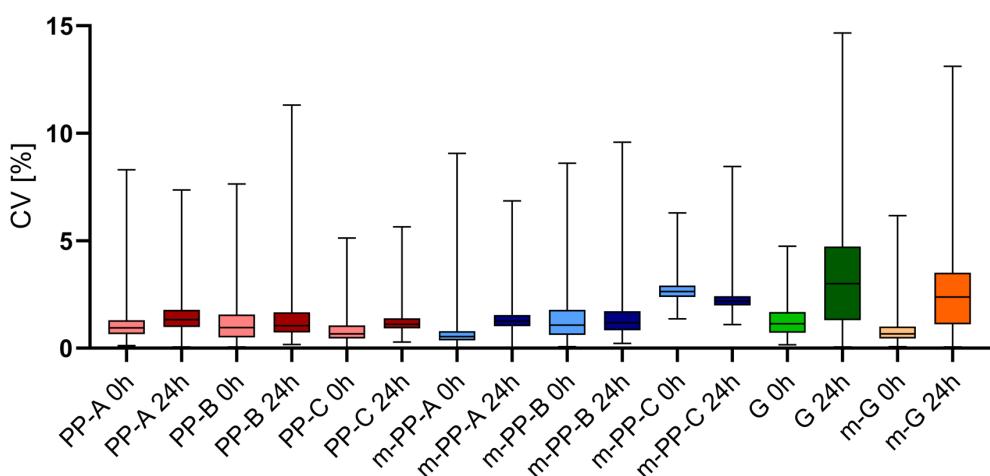


Abbildung 10: Varianzkoeffizient der Replikatmessungen vor und nach Inkubation. Dargestellt sind die Variationskoeffizienten (CV) der Peptidabundanzen von insgesamt 3.531 Peptiden vor und nach der Inkubation, jeweils für beide Gefäßtypen der Hersteller A, B, C und D. Boxplots zeigen den Median (Linie), das 25.–75. Perzentil (Box) sowie die minimalen und maximalen Werte (Whiskers, min–max) der Messungen.

Um die Genauigkeit und Präzision der durchgeführten Messungen weiter zu belegen, wurde zusätzlich der Pearson-Korrelationskoeffizient zwischen den Replikaten jedes Gefäßtyps bestimmt (Abbildung 11). Die Analyse zeigt, dass für die PP-Gefäße eine hohe Pearson-Korrelation von über 96 % zwischen den Replikaten vorliegt, was auf eine konsistente und zuverlässige Wiederholbarkeit der Ergebnisse hinweist. Für die Glasgefäße wurde sogar eine

noch höhere Korrelation von über 98 % in den Kontrollproben (0 h) beobachtet, was die Robustheit der Messungen im Rahmen des entwickelten Assays weiter untermauert.

Nach einer 24-stündigen Inkubation mit dem HeLa-Peptidstandard zeigten die Glasgefäße jedoch deutlich größere Schwankungen in den Peptidabundanzen sowie niedrigere Pearson-Korrelationskoeffizienten zwischen den Replikaten.

Auch bei den PP-Gefäßen ließ sich nach 24 h eine Reduktion der Korrelationswerte im Vergleich zu den 0 h-Proben beobachten. Dies traf auf die Gefäße der Hersteller A, B und C zu. Für die modifizierten PP-Gefäße (m-PP) von Hersteller A und C konnte hingegen keine signifikante Reduktion festgestellt werden. Bei den Herstellern B und D zeigte sich dagegen sowohl bei den modifizierten PP-Gefäßen (m-PP) als auch bei den modifizierten Glasgefäßen (m-G) ein Rückgang der Pearson-Korrelation nach 24 h.

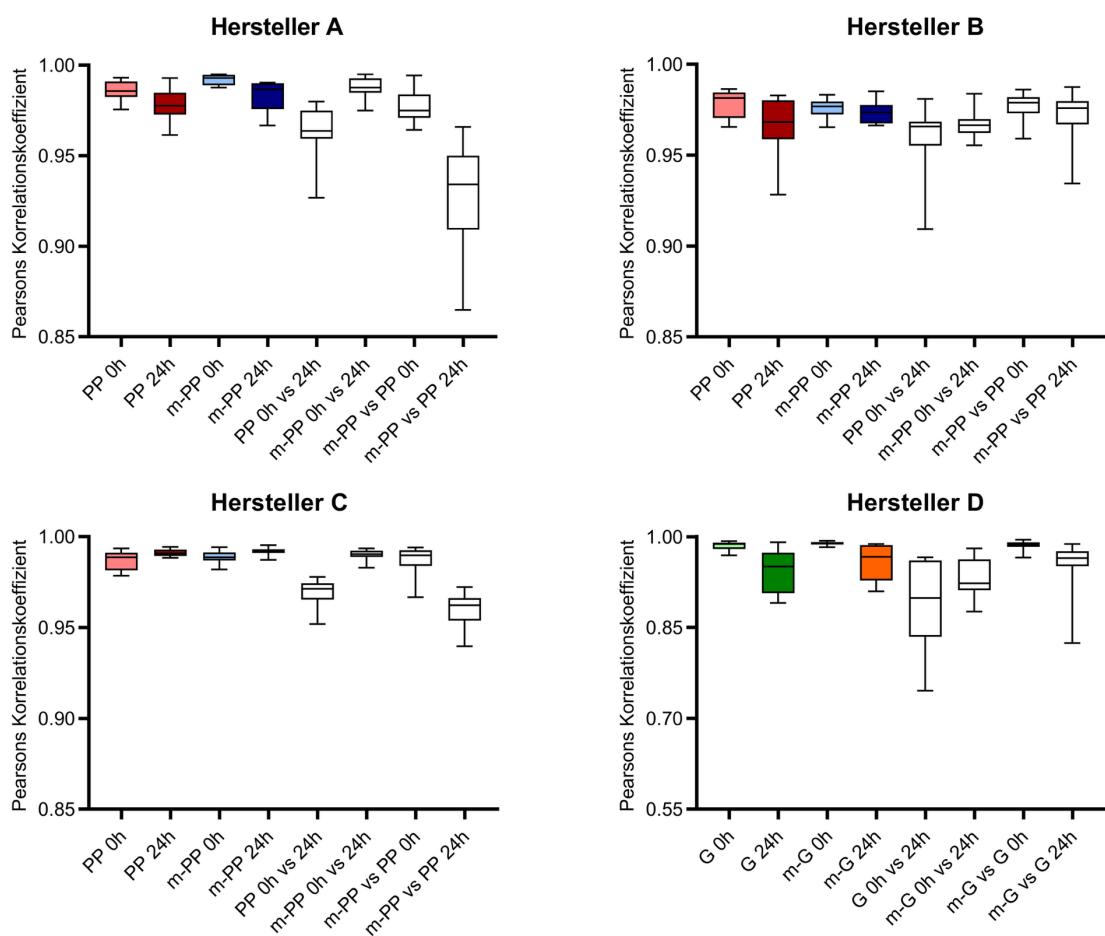


Abbildung 11: Boxplot-Darstellung der Pearson-Korrelationskoeffizienten zwischen verschiedenen Gefäßtypen und Proben der jeweiligen Hersteller. Boxplots zeigen den Median (Linie), das 25.–75. Perzentil (Box) sowie die minimalen und maximalen Werte (Whiskers, min–max) der Messungen. Basierend auf 3.531 Peptiden.

Im Anschluss an die vorangehenden Untersuchungen wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt, um potenzielle Unterschiede in den Wechselwirkungen zwischen den

Oberflächen der verschiedenen Gefäßtypen unterschiedlicher Hersteller (A, B, C, D) und Typen (PP, m-PP, G, m-G) zu identifizieren. Die PCA kann signifikante Differenzierungen und Clusterbildungen zeigen, die sich entlang der Hauptkomponenten 1 (PC 1) und 2 (PC 2) manifestieren und auf deutliche Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit sowie den daraus resultierenden Wechselwirkungen mit den Peptiden hinweisen können. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt.

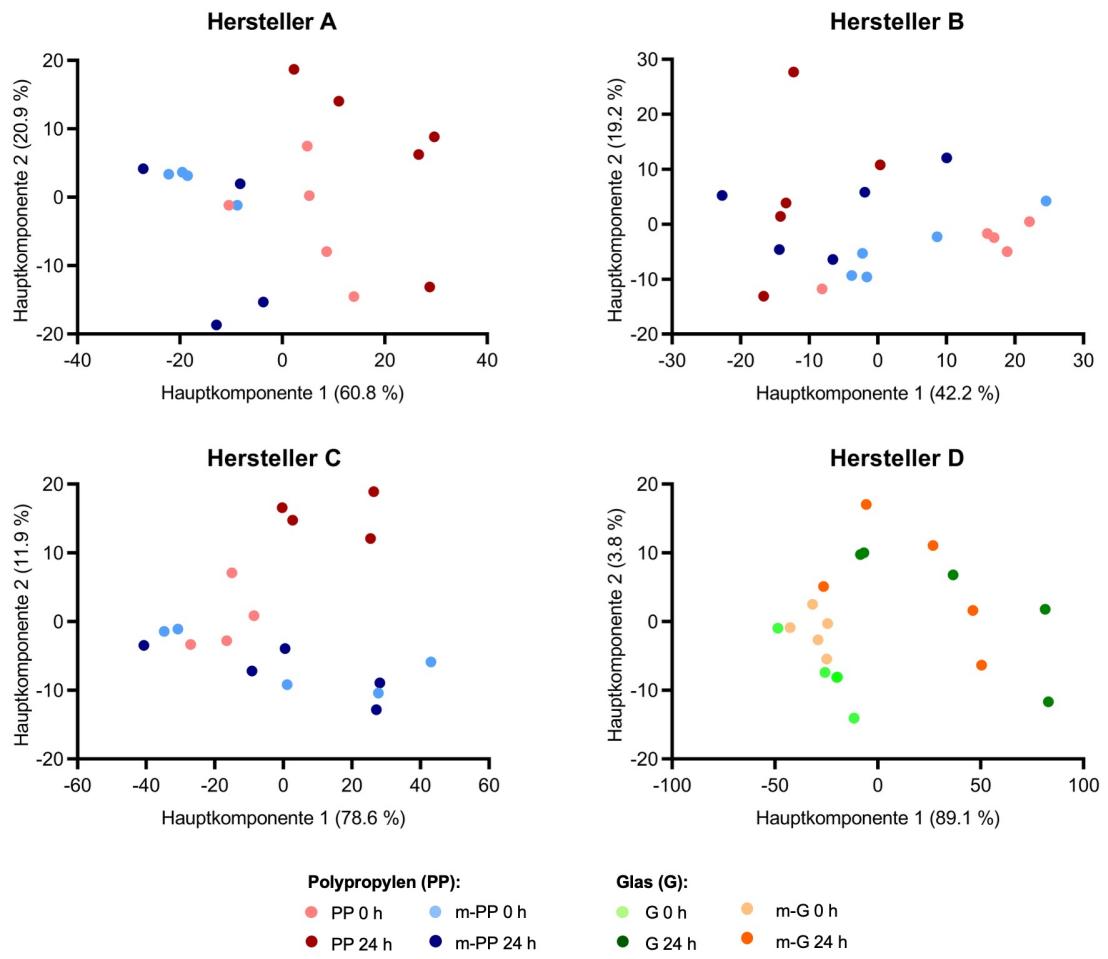


Abbildung 12: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Peptidabundanzen vor und nach Inkubation. Dargestellt ist die Verteilung der Inkubationszeitpunkte (0h, 24h) und Gefäße je Hersteller (A, B, C, D) basierend auf der Gesamtvariation der Peptiddaten. Die ersten beiden Hauptkomponenten (PC1 und PC2) erklären den größten Anteil der Varianz im Datensatz. Basierend auf 3.531 Peptiden. Für Hersteller A lässt sich eine Clusterbildung der modifizierten PP-Gefäße vor und nach 24-stündiger Inkubation beobachten. Die Kontrollen der nicht-modifizierten PP-Gefäße zeigen entlang der Hauptkomponente 1, die 60,8 % der Varianz der Daten erklärt, eine deutliche Ähnlichkeit zu der Kontrolle und den inkubierten m-PP-Gefäßen, während die 24 Stunden inkubierten PP-Gefäße deutlich entfernt clustern. Ein ähnliches Muster lässt sich für Hersteller C beobachten. Die 24-stündige Inkubation in m-PP-Gefäßen zeigt keine signifikante Veränderung. Für den Hersteller B zeigt sich hingegen eine signifikante Veränderung zwischen der Kontrollprobe

(0 h) und der 24 Stunden inkubierten Probe (24 h) bei PP und m-PP nach Hauptkomponente 1 (42,2 %).

Zudem zeigen die Ergebnisse eine signifikante Trennung der Gefäßgruppen entlang der Hauptkomponente 1 (89,1 %) nach der Inkubation der Peptide über 24 Stunden in Glas (G) und modifizierten Glasgefäßen (m-G).

6.1.5. Quantifizierung adsorbierter Peptide

Die vorangegangenen Qualitätskontrollen, insbesondere die PCA (Abbildung 11), zeigten bereits eine klare Unterscheidung der PP-Gefäße und modifizierter PP-Gefäße. Jedoch lässt sie keine quantitative Beurteilung zu. Die quantitative Proteomanalytik ermöglicht über die Label-freie Quantifizierung von Peptiden einen relativen, quantitativen Vergleich zwischen definierten Gruppen, hier Peptidabundanz nach 0 h und 24 h, für jedes gemessenes Peptid. Dazu wurden die quantitativen Werte aller Peptide über einen Welch's t-Test vor und nach Inkubation verglichen, um signifikante Veränderungen zu identifizieren.

Peptide, die sowohl einen p -Wert $< 0,05$, als auch einen \log_2 -Fold-Change von mindestens -1 aufwiesen (entspricht einer mindestens halbierten Abundanz), wurden als signifikant verändert bzw. adsorbiert eingestuft. Die Ergebnisse der t-Tests sind in Form von Volcano-Plots in Abbildung 13 dargestellt.

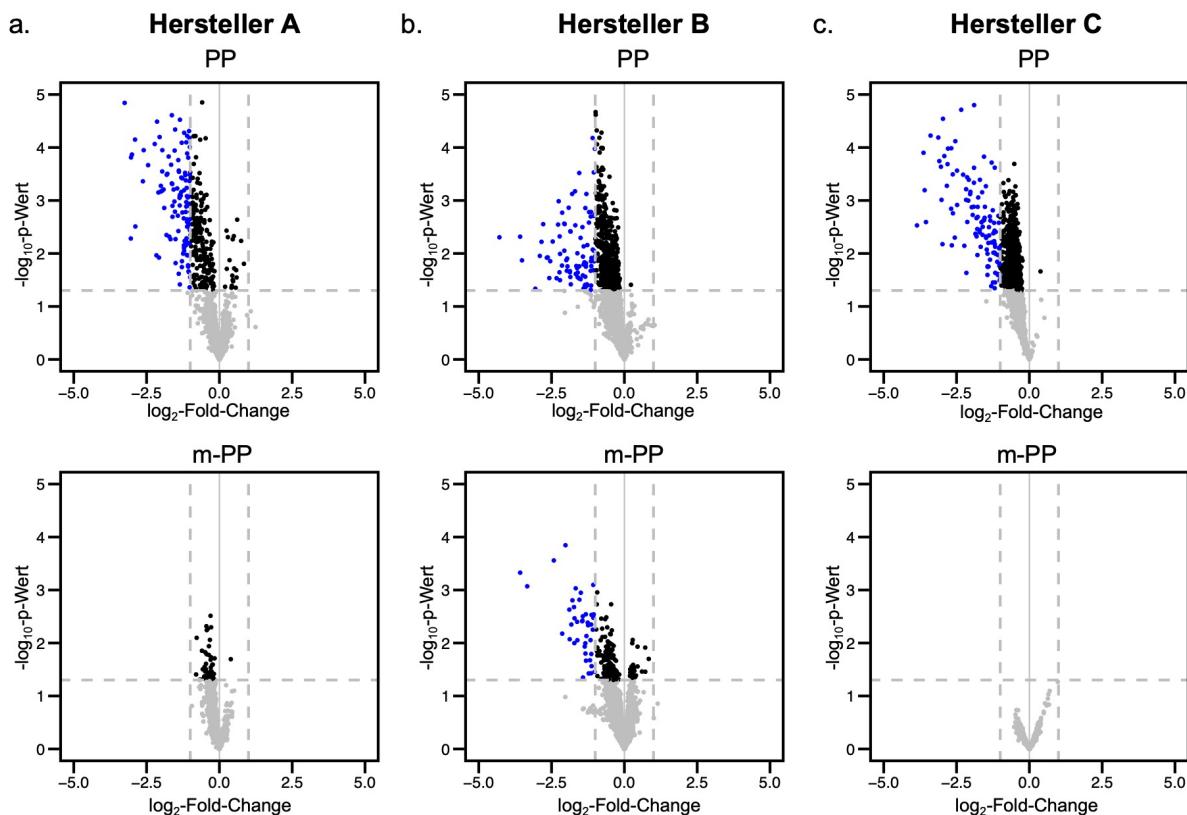


Abbildung 13: Volcano-Plot-Darstellung signifikanter Peptidveränderungen nach Inkubation in PP- und m-PP-Gefäßen. Relativer quantitativer Vergleich der Peptidabundanzen zwischen definierten Gruppen, hier vor (0 h) und nach (24 h) Inkubation für PP-Hersteller A, B und C. Zur Identifikation signifikanter Veränderungen wurde für jedes Peptid ein Welch's t-Test durchgeführt. Peptide mit einem p -Wert $< 0,05$ und einem \log_2 -Fold-Change ≤ -1 wurden als signifikant verändert bzw. adsorbiert klassifiziert. Die Ergebnisse sind als Volcano-Plots dargestellt, wobei die Peptide entsprechend ihres \log_2 -Fold-Changes und der statistischen Signifikanz visualisiert sind. In blau: signifikant adsorbierte Peptide, in schwarz: p -Wert-signifikante Peptide, in grau: nicht signifikante Peptide. Basierend auf 3.531 Peptiden.

Es konnte bei allen drei Herstellern von PP-Gefäßen festgestellt werden, dass nicht-modifizierte Polypropylen-Gefäße (PP) signifikante Mengen an Peptiden adsorbieren, sofern sie in einer Lösung gelagert werden, die 0,1 % FA in Wasser enthält. Die höchste Anzahl adsorbiertener Peptide wurde nach einer 24-stündigen Inkubation in Gefäßen des Herstellers C festgestellt, mit insgesamt 116 adsorbierten Peptiden. Im Vergleich dazu wurden in den Gefäßen des Herstellers A 112 Peptide und in den Gefäßen des Herstellers B 88 Peptide adsorbiert. Im Gegensatz dazu zeigen m-PP-Gefäße der Hersteller A und C keine signifikante Peptidadsorption. Die m-PP-Gefäße des Herstellers B adsorbierten demgegenüber signifikant 42 Peptide.

Das von den Herstellern modifizierte Material der Polypropylen-Gefäße (m-PP) trägt signifikant dazu bei, die Adsorption von Peptiden zu verringern. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Selektion des Gefäßtyps und -materials von entscheidender Relevanz für die Integrität der Proben in analytischen Verfahren ist. So weisen normale PP-Gefäße erhebliche Peptidadsorptionseffekte auf, während die Verwendung von m-PP-Gefäßen eine signifikante Reduktion dieser Adsorptionseffekte ermöglicht.

Dieselbe Analyse wurde ebenfalls für die Glas-Gefäße durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.

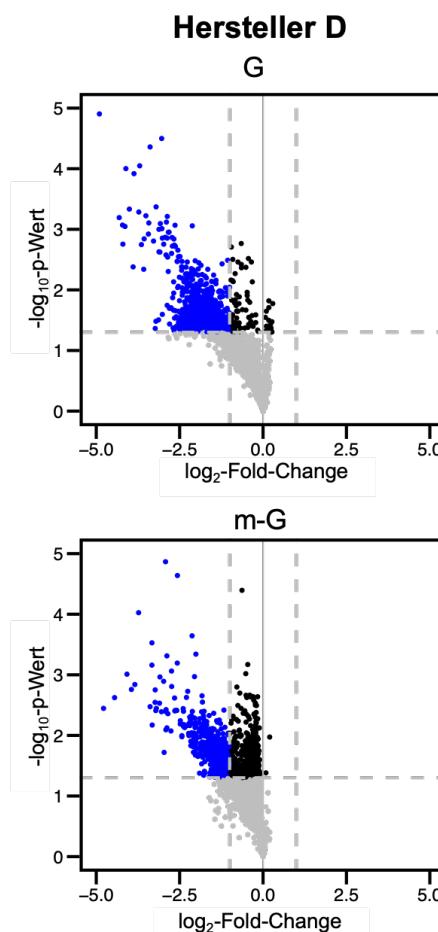


Abbildung 14: Volcano-plot-Darstellung signifikanter Peptidveränderungen nach Inkubation in G- und m-G-Gefäßen. Dargestellt ist der relative quantitative Vergleich der Peptidabundanzen zwischen definierten Gruppen, hier vor (0 h) und nach (24 h) Inkubation für Glas-Gefäße der Hersteller A, B und C. Zur Identifikation signifikanter Veränderungen wurde für jedes Peptid ein Welch's t-Test durchgeführt. Peptide mit einem p -Wert $< 0,05$ und einem \log_2 -Fold-Change ≤ -1 wurden als signifikant verändert bzw. adsorbiert klassifiziert. Die Ergebnisse sind als Volcano-Plots dargestellt, wobei die Peptide entsprechend ihres \log_2 -Fold-Changes und der statistischen Signifikanz visualisiert sind. In blau: signifikant adsorbierte Peptide, in schwarz: p -Wert signifikante Peptide, in grau: nicht signifikante Peptide. Basierend auf 3.531 Peptiden.

Hinsichtlich der Peptidadsorption zeigten Glas-Gefäße (G) und modifizierte Glas-Gefäße (m-G) signifikant stärkere Effekte als das Polypropylen. Insgesamt wurden in den G-Gefäßen 812 Peptide adsorbiert, während in den m-G-Gefäßen 655 Peptide adsorbiert wurden. In den G-Gefäßoberflächen wurden somit mehr als 18 % der untersuchten Peptide adsorbiert.

6.1.6. Vergleich adsorbiertter Peptide

Nachdem eine erhebliche Adsorption an den PP-Gefäßen aller drei Hersteller sowie bei den m-PP-Gefäßen von Hersteller B nachgewiesen werden konnte, sollte nun ein direkter Vergleich der adsorbierten Peptide zeigen, ob diese Überschneidungen zwischen den getesteten Oberflächen aufweisen. Die Ergebnisse sind als UpSet-Diagramm in Abbildung 15 dargestellt.

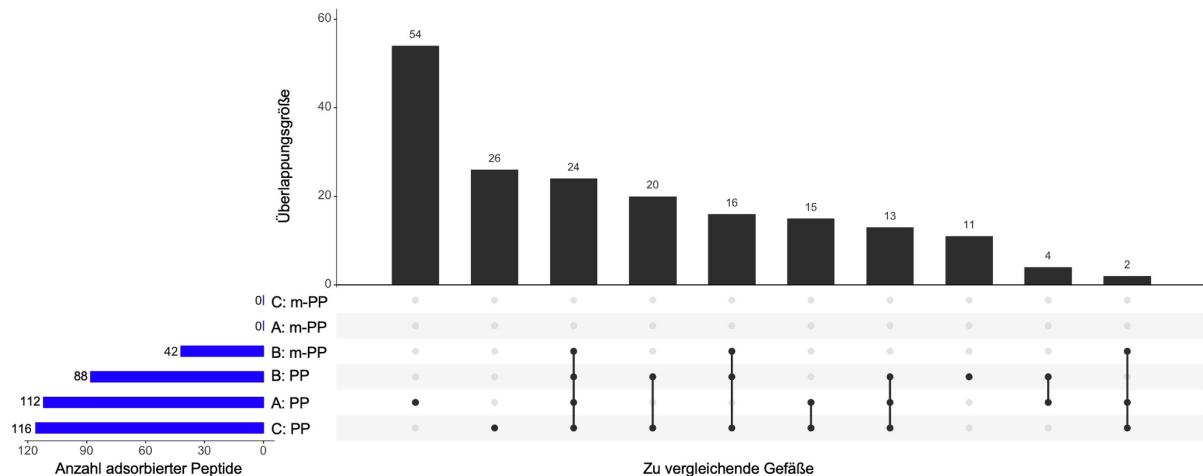


Abbildung 15: Analyse der Überschneidung adsorbierter Peptide zwischen verschiedenen PP-Gefäßtypen.
 Zur Identifikation von Peptiden mit Oberflächenadsorption wurden zunächst für jedes Peptid die signifikanten Veränderungen in der Abundanz vor (0 h) und nach (24 h) Inkubation bestimmt ($p < 0,05$ und \log_2 -Fold-Change ≤ -1). Anschließend wurde ein direkter Vergleich der adsorbierten Peptide zwischen PP-Gefäßen der Hersteller A, B und C sowie den m-PP-Gefäßen von Hersteller B durchgeführt. Die Überschneidungen und exklusiven Peptide wurden mithilfe eines UpSet-Diagramms visualisiert. Verbundene Punkte markieren die verglichenen Datensätze, die Überlappungsgröße ist in Form von Balkendiagrammen visualisiert.

54 der insgesamt 112 an PP-Gefäßen von Hersteller A adsorbierten Peptide wurden lediglich in diesem Gefäß adsorbiert. Bei PP-Gefäßen von Hersteller B wurden 11 der 88 Peptide nur an dieses Material adsorbiert. Bei PP-Gefäßen von Hersteller C sind es 26 von 116. Demensprechend gibt es für einen Großteil der adsorbierten Peptide eine große Überschneidung zwischen den drei verschiedenen PP-Gefäßen. Alle an m-PP-Gefäßen von Hersteller B adsorbierten Peptide wurden auch an andere Gefäßoberflächen adsorbiert. Allein 24 Peptide wurden bei allen 4 adsorbierenden Oberflächen als signifikant niedriger in der Lösung nach Inkubation identifiziert.

Für die Glasoberflächen wurde dieser Vergleich zwischen den an G- und m-G-Gefäßen adsorbierten Peptiden durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Venn-Diagramm in Abbildung 16 dargestellt.

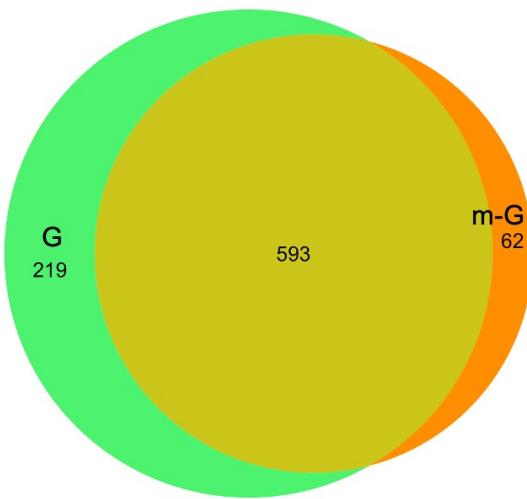


Abbildung 16: Analyse der Überschneidung adsorbierter Peptide an Glas-(G) und modifizierten Glas-(m-G) Gefäßen von Hersteller D. Zur Identifikation adsorbierter Peptide wurden für jedes Peptid die signifikanten Veränderungen der Abundanz vor (0 h) und nach (24 h) Inkubation bestimmt ($p < 0,05$ und $\log_2\text{-Fold-Change} \leq -1$). Die überschneidenden und exklusiven Peptide zwischen den beiden Gefäßtypen wurden in einem Venn-Diagramm dargestellt.

Von den insgesamt 812 an G und 655 an m-G adsorbierten Peptiden wurden 593 in beiden Gefäßen adsorbiert. G-Gefäße adsorbierten allein 219 Peptide und damit 157 Peptide mehr als das m-G-Gefäß.

6.1.7. Nicht-detektierbare Peptide nach Inkubation

Ein Anteil der Peptide wurde bei der Inkubation in einigen Gefäßtypen so stark adsorbiert, dass ihre Konzentration anschließend unterhalb der Signalgrenze für eine MS2-Selektion bzw. unter der Identifikationsschwelle in der Datenbanksuche lag. In der Datenbanksuche werden solche Peptide daher nicht mehr mit einem Abundanzwert versehen, selbst wenn sie eventuell noch identifiziert werden konnten. Aufgrund der zuvor beschriebenen Kriterien zur Datenaufbereitung wurden diese Peptide aus der statistischen Analyse ausgeschlossen.

Zur Abschätzung des Ausmaßes dieses Effekts wurde ermittelt, wie viele Peptide in allen Replikaten der 0 h-Kontrolle detektiert, jedoch in keinem Replikat der 24 h-Inkubation quantifiziert wurden.

Tabelle 12: Anzahl der Peptide, die nach der Inkubation in keinem Replikat mehr quantifiziert wurden.

Gefäß	PP Hersteller A	PP Hersteller B	PP Hersteller C	G Hersteller D
Anzahl Peptide (unmodifiziertes Gefäß)	63	114	412	104
Anzahl Peptide (modifiziertes Gefäß)	1	113	0	101

Wie erwartet, zeigte sich in den unmodifizierten Gefäßen ein teils erheblicher Verlust an Peptiden. In den modifizierten Varianten war dieser Effekt deutlich reduziert, was die Wirksamkeit der Oberflächenmodifikation gegen die Adsorption unterstreicht.

Bemerkenswert ist jedoch, dass im modifizierten Gefäß m-PP von Hersteller A ein einzelnes Peptid (ENQCVIISGESGAGK) nach 24 h-Inkubation nicht mehr detektiert werden konnte, obwohl es in der 0 h-Kontrolle mit vergleichsweise hoher Intensität ($6,9-7,7 \times 10^5$) vorlag. Dieses Verhalten ist insofern auffällig, als alle anderen Peptide in diesem Gefäßtyp nicht signifikant adsorbiert wurden.

6.1.8. Untersuchung der Eigenschaften adsorbierter Peptide

Aufgrund der signifikanten Überschneidungen adsorbierter Peptide auf PP- und G-Gefäßoberflächen verschiedener Hersteller wurde eine detaillierte Charakterisierung der Peptid-Oberflächen-Interaktionen unter den Lösungsmittelbedingungen von 0,1 % FA in Wasser durchgeführt. Dafür wurden die Gefäße aus PP von Hersteller A, B und C sowie G von Hersteller D ausgewählt und die Aminosäuresequenz, Peptidlänge, Ladung und Hydrophobizität adsorbierter Peptide untersucht.

Zunächst sollte die Aminosäurezusammensetzung adsorbierter und nicht-adsorbierter Peptide verglichen werden. Zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit wurden ausschließlich Peptide mit einer Länge von 15 Aminosäuren in die Analyse der Aminosäurekomposition einbezogen, da diese Peptidklasse am häufigsten vorkam und somit die größte Stichprobe bot. Die Anteile der Aminosäuren, klassifiziert nach hydrophob, neutral, basisch und sauer, wurden jeweils als prozentualer Anteil an der Peptidlänge berechnet. Die Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung sind in Abbildung 17 für PP-Gefäße der Hersteller A, B und C sowie für Glasgefäße von Hersteller D dargestellt.

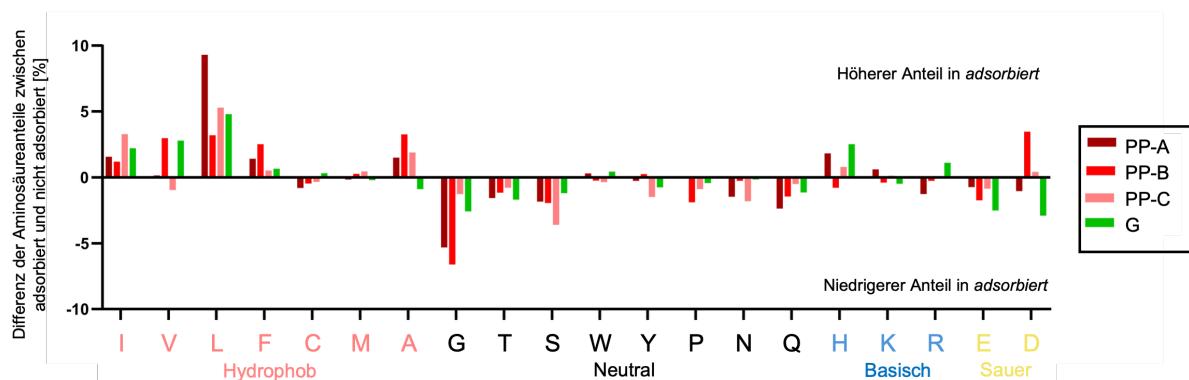


Abbildung 17: Analyse der Aminosäurezusammensetzung adsorbierter und nicht-adsorbierter Peptide. Zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit wurden ausschließlich Peptide mit einer Länge von 15 Aminosäuren berücksichtigt. Die Anteile hydrophober (basierend auf GRAVY-Skala), neutraler, basischer und saurer Aminosäuren wurden als prozentualer Anteil an der Peptidlänge berechnet. Die Ergebnisse werden für PP-Gefäße der Hersteller A, B und C sowie für Glasgefäße (G) von Hersteller D dargestellt.

Dabei zeigte sich, dass hydrophobe Aminosäuren, insbesondere Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin und Phenylalanin in adsorbierten Peptiden im Vergleich zu nicht-adsorbierten signifikant überrepräsentiert waren. Die Klassifizierung als hydrophobe Aminosäure erfolgte basierend auf positiven GRAVY-Werten ermittelt nach dem Hydropathie-Index von Kyte und Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982). Für die ebenfalls laut Skala hydrophoben Aminosäuren Cystein und Methionin konnte hingegen kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit zwischen adsorbierten und nicht adsorbierten Peptiden festgestellt werden. Dies lässt sich durch zwei Faktoren erklären: Zum einen wurden Cysteinreste im Rahmen der Probenvorbereitung mittels Idoacetamid carbamidomethyliert, was die ursprüngliche Hydrophobizität der Seitenkette verändert und damit die Aussagekraft des GRAVY-Werts (Cystein: 2,5) einschränkt. Auch die Anzahl Methionin-haltiger Peptide ist durch die Entfernung von Peptiden mit oxidiertem Methionin, sowie ihrer nicht-oxidierten Pendants reduziert, was die statistische Aussagekraft entsprechend minderte. Zwar weisen sowohl Cystein als auch Methionin (GRAVY: 1,9) hohe hydrophobe Werte auf, jedoch spiegelte sich dies nicht im Adsorptionsverhalten wider.

Neutrale Aminosäuren wie Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Asparagin, Glutamin, Tyrosin und Glycin traten in adsorbierten Peptiden auf PP-Gefäßen hingegen seltener auf als in nicht-adsorbierten Peptiden. Ähnliche Tendenzen wurden auch für adsorbierte Peptide auf Glasgefäßen beobachtet. Zusätzlich waren dort basische Aminosäuren (Histidin, Lysin, Arginin) signifikant überrepräsentiert, während saure Aminosäuren (Glutamat, Aspartat) unterrepräsentiert waren.

Ein weiterer Faktor, der auf seinen Einfluss auf die Adsorption untersucht wurde, ist die Peptidlänge. Dazu wurde die Anzahl der Aminosäuren pro Peptid für die adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptide und das Vorkommen (in %) für jede Gruppe berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt.

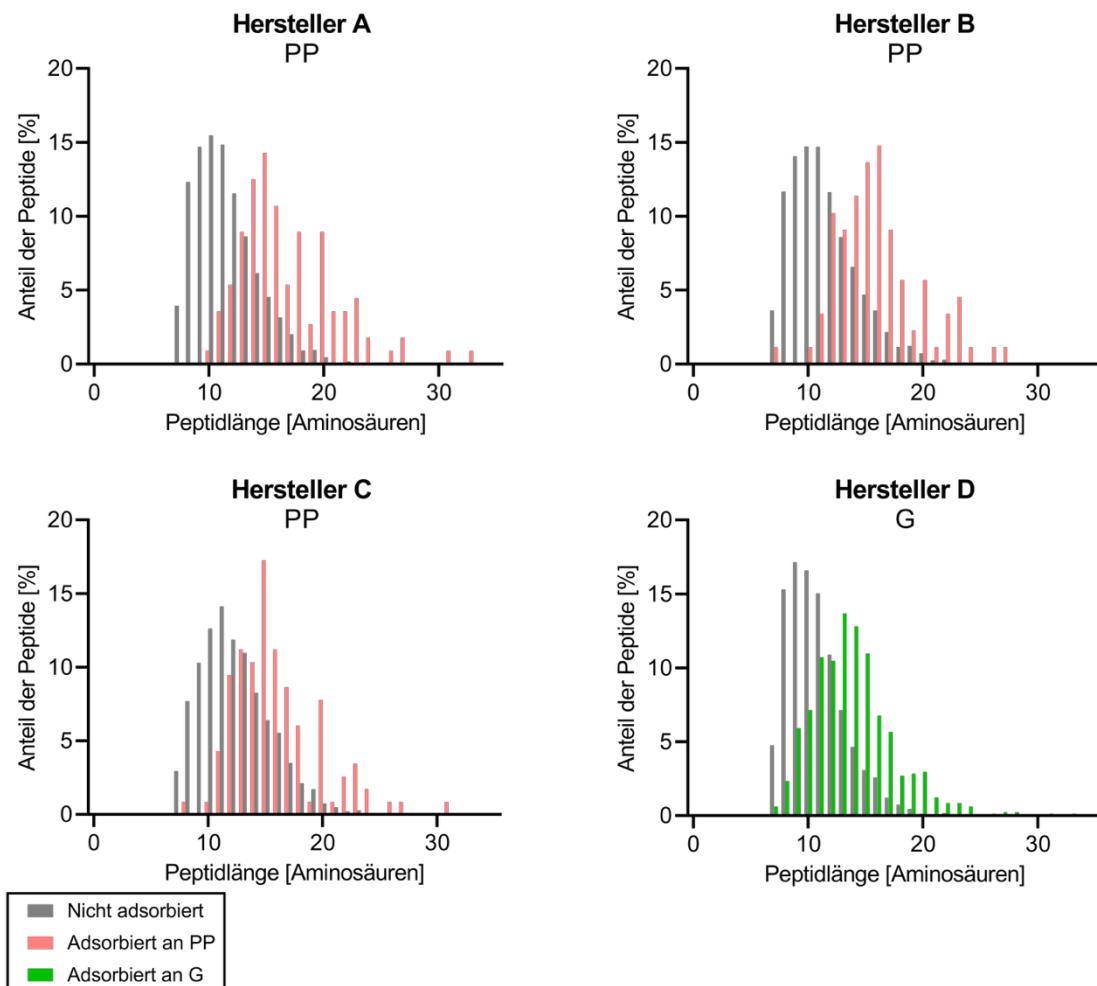


Abbildung 18: Analyse des Einflusses der Peptidlänge auf die Adsorption. Für adsorbierte und nicht-adsorbierte Peptide wurde die Anzahl der Aminosäuren pro Peptid ermittelt und das Vorkommen jeder Peptidlänge als prozentualer Anteil innerhalb der jeweiligen Gruppe berechnet. Die Ergebnisse geben Aufschluss darüber, wie die Peptidlänge die Adsorptionsneigung beeinflusst für PP von Hersteller A, B und C sowie G von Hersteller D.

Die nicht an PP-Gefäße gebundenen Peptide wiesen eine mittlere Länge von 11,2 (Hersteller A), 11,4 (Hersteller B) und 12,1 (Hersteller C) Aminosäuren auf, während die an PP-Gefäßen adsorbierten Peptide bei allen PP-Herstellern eine deutlich höhere mittlere Länge (>40 %) hatten (A: 17, B: 16, C: 16). Peptide, die an G adsorbiert wurden, waren ebenfalls länger, mit einem Mittelwert von 14 Aminosäuren, die an G adsorbiert wurden, im Vergleich zu 11 Aminosäuren langen Peptiden, die nicht an G adsorbiert wurden.

Durch die Inkubation der Peptide in 0,1 % FA mit einem pH-Wert von 2,7 sind alle basischen Aminosäuren sowie der N-Terminus der Peptide protoniert. Das bedeutet, dass jedes tryptische Peptid mit Lysin/Arginin am C-Terminus mindestens zwei positive Ladungen aufweist. Durch das Vorkommen von sogenannten „missed cleavages“ oder Histidin in der Sequenz sind auch höhere Ladungszustände möglich. Für die adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptide wurde der Ladungszustand in der sauren Lösung berechnet und anteilig dargestellt und verglichen (Abbildung 19).

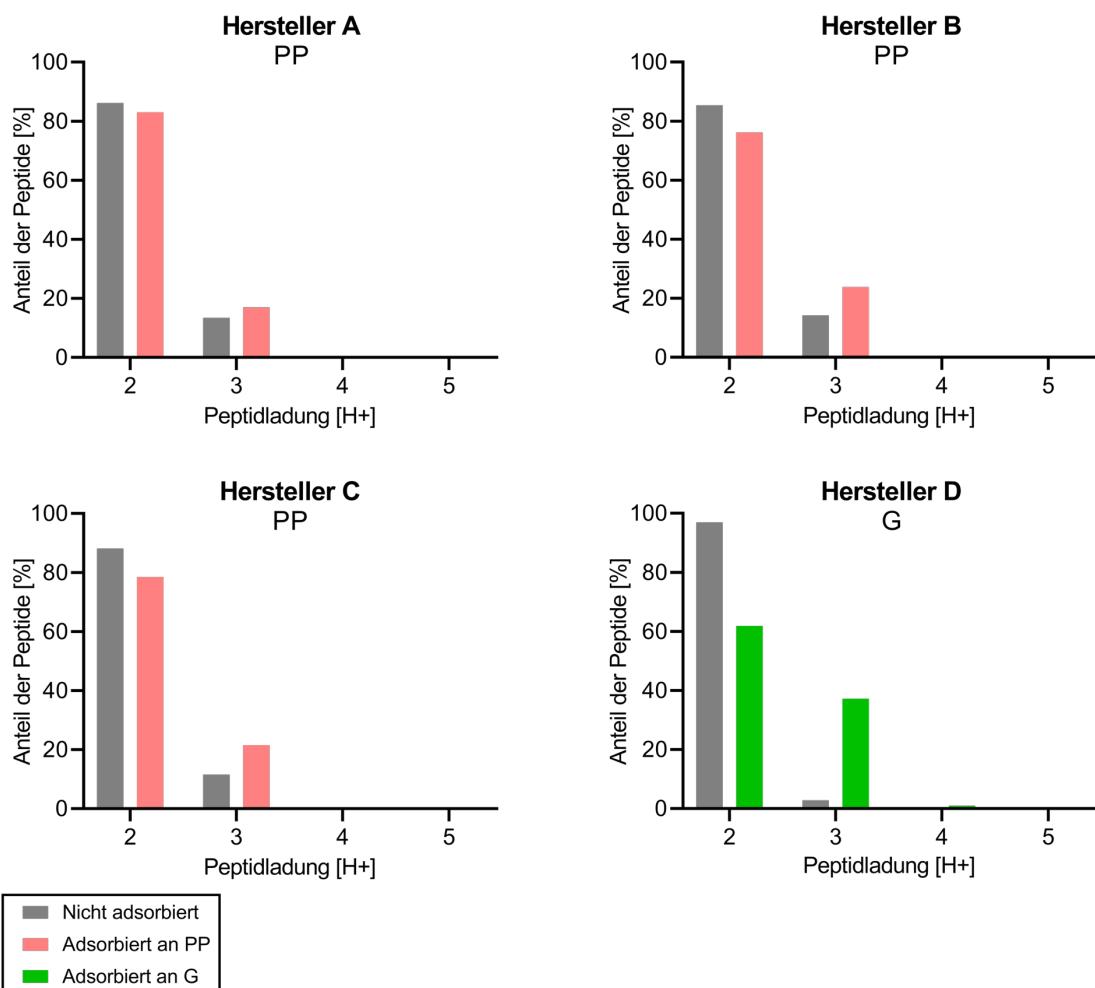


Abbildung 19: Vergleich der Peptidladung zwischen adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden. Die potenziellen Ladungen der Peptide wurden unter den Bedingungen der Inkubation in 0,1 % FA (pH 2,7) berechnet (nach pKs-Werten von Bjellqvist (Bjellqvist et al., 1993)), wobei basische Aminosäuren und der N-Terminus protoniert sind. Peptide mit Lysin oder Arginin am C-Terminus tragen mindestens zwei positive Ladungen; zusätzliche Ladungen können durch „missed cleavages“ oder Histidin auftreten. Die Darstellung zeigt den Anteil der Peptide mit unterschiedlichen Ladungen in den beiden Gruppen für PP von Hersteller A, B und C sowie G von Hersteller D. Die Ladungen sind gerundet sind gerundet auf ganze Zahlen dargestellt.

Bei Peptiden, die an G-Gefäßoberflächen adsorbiert wurden, wurde eine signifikant höhere Menge an +3 geladenen (gerundet) Peptiden (+34,4 %) im Vergleich zu nicht an G gebundenen Peptiden beobachtet. Dies kann auf die höhere Wahrscheinlichkeit des Auftretens von positiv geladenen Histidinresten in längeren tryptischen Peptiden zurückgeführt werden. Bei Peptiden, die an PP gebunden wurden, ließ sich dieser Effekt nicht nachweisen. Hier gibt es zwar auch einen leicht höheren Anteil 3-fach positiv geladener Peptide, jedoch sind die adsorbierten Peptide, wie in Abbildung 17 zuvor gezeigt, länger und haben eine höhere Wahrscheinlichkeit Histidin zu enthalten.

Die Berechnung der Hydrophobizität beruht auf den einzelnen Aminosäuren der Peptide und kann unter anderem mit Hilfe der GRAVY-Werte bestimmt werden. Jede Aminosäure hat auf einer Skala von -4,5 (hydrophil) bis +4,5 (hydrophob) einen bestimmten Hydropathie-Wert. Basierend auf diesen Werten wurde für alle nicht-adsorbierten und die adsorbierten Peptide

der GRAVY-Wert bestimmt und die Signifikanz des Unterschieds über einen Mann-Whitney-U-Test bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

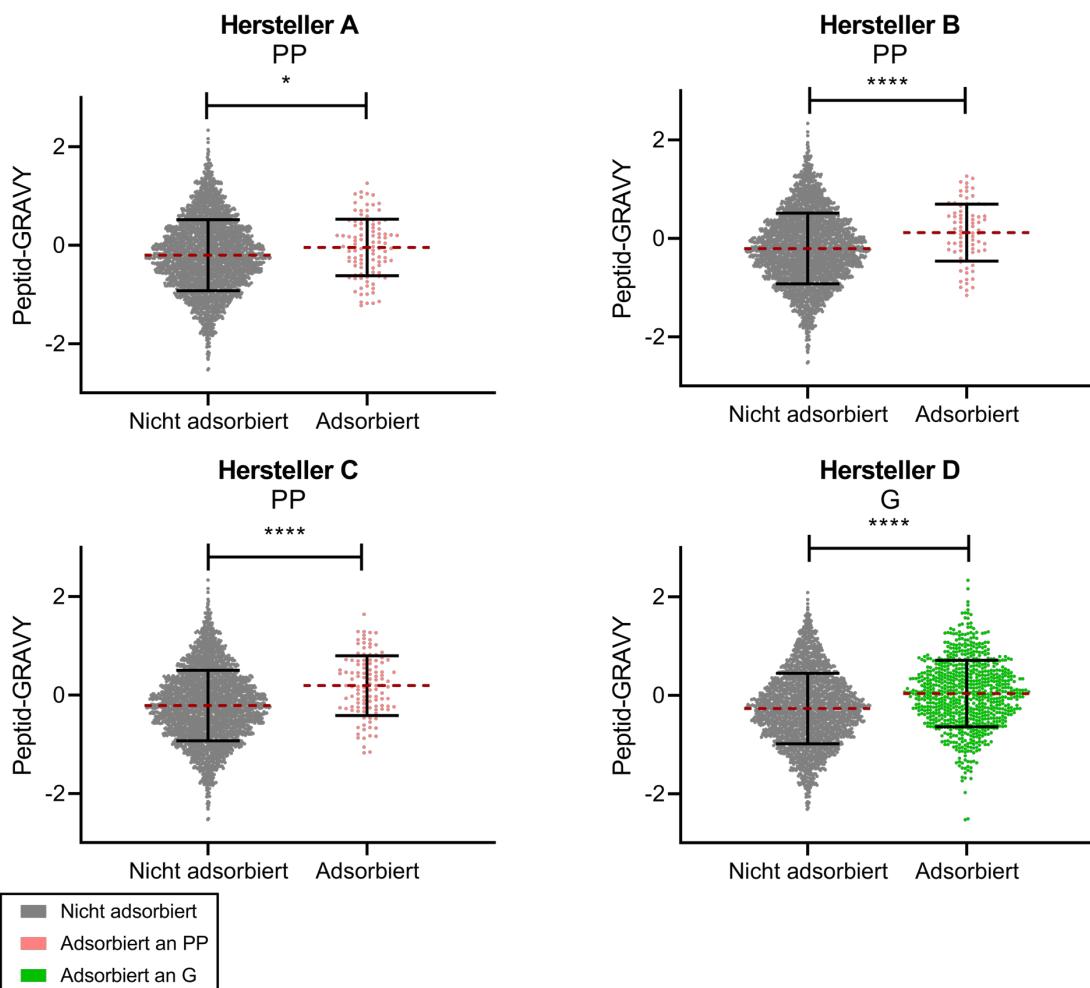


Abbildung 20: Vergleich der Hydrophobizität (GRAVY-Wert) zwischen adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden. Die GRAVY-Werte wurden nach der Methode von Kyte und Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982) berechnet, um den durchschnittlichen hydrophoben Charakter der Peptide zu bestimmen. Die Darstellung als Violinplots zeigt den Anteil der Peptide mit unterschiedlichen GRAVY-Werten in den beiden Gruppen für PP-Gefäße der Hersteller A, B und C sowie Glasgefäß von Hersteller D, um den Einfluss der Hydrophobizität auf die Adsorptionsneigung zu verdeutlichen. Signifikante Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt, wobei signifikante Unterschiede wie folgt gekennzeichnet sind: *: p -Wert $< 0,05$, **: p -Wert $< 0,01$, ***: p -Wert $< 0,001$, ****: p -Wert $< 0,0001$, n. s.: p -Wert $> 0,05$. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) der Mittelwerte.

Beim Vergleich der Peptidhydrophobizität zwischen adsorbierten und nicht adsorbierten Peptiden wurde ein signifikant höherer mittlerer GRAVY-Wert (p -Wert $< 0,05$) für adsorbierte Peptide bei allen drei PP-Gefäßen sowie der Glasoberfläche beobachtet. Dabei war der Unterschied im GRAVY-Wert zwischen nicht-adsorbierten und adsorbierten Peptiden für PP von Hersteller B und C (Mediandifferenz B: 0,3580, Mediandifferenz C: 0,4072) und G von Hersteller D am größten (Mediandifferenz: 0,3168) und niedriger für Hersteller A (Mediandifferenz A: 0,1688).

Die Kombination der Auswertung der Adsorptionsstärke sowie der zugrundeliegenden Ursachen ermöglicht eine umfassende Beurteilung der Wechselwirkung zwischen Analyten

und Oberfläche im Lösungsmittel und bildet die Grundlage für den sogenannten APS-Assay (Adsorption-Properties-of-Surfaces-Assay).

Die APS-Ergebnisse der PP-Gefäße von Hersteller A, B und C sind für die adsorbierten Peptide in den Tabellen A1, Tabelle A2 und Tabelle A3 aufgelistet. Alle weiteren APS-Assay-Ergebnisse für die Gefäße der Hersteller A, B, C und D sind im öffentlichen Repositoryn verfügbar (Tabelle S2, DOI: 10.25592/uhhfdm.18057).

6.2. Optimierung des APS-Assays

6.2.1. Das APS-Assay-Skript – Automatisierte Datenauswertepipeline

Zur vereinfachten Datenauswertung wurde ein automatisiertes, Python-basiertes Skript entwickelt, das die zuvor manuell durchgeführte Datenaufbereitung und -analyse automatisiert. Als Eingabe dient eine Tabelle, welche die Peptidsequenzen, die Modifikationen sowie die Peptidabundanzen der beiden Gruppen (z. B. 0 h und 24 h) enthält.

Anders als bei der manuellen Auswertung ist keine manuelle Datenvorbereitung und Filterung notwendig. Alle mehrfach vorkommenden Peptide sowie Peptide mit variablen Modifikationen werden entfernt und alle Zwischenschritte als Tabellen ausgegeben. Zusätzlich zum Welch's t-Test wird mit der Benjamini-Hochberg-Methode die *False Discovery Rate* (FDR) bestimmt und ein q-Wert ausgegeben. Mit den voreingestellten Schwellenwerten werden Peptide, die einen q-Wert $< 0,1$ und eine \log_2 -Fold-Change ≤ -1 haben, als adsorbiert klassifiziert. Die Peptide erhalten in der Ergebnisübersicht die Bezeichnung *adsorbed* (adsorbiert), während alle anderen den Status *not adsorbed* (nicht adsorbiert) erhalten. Außerdem wird eine Tabelle der Peptide generiert, die nur in den Kontrollen quantifiziert wurden, aber nicht in den inkubierten Proben.

Für jedes Peptid wird der GRAVY-Wert, die Peptidlänge sowie der Ladungszustand berechnet. Die Berechnung der Ladung erfolgt abhängig vom vorgegebenen pH-Wert, wobei die pKs-Werte der Aminosäurereste nach Bjellqvist-Skala (Bjellqvist et al., 1993) herangezogen werden. Die ermittelte Ladung wird anschließend auf ganze Ladungszustände gerundet dargestellt. Die APS-Assay-Ergebnisse werden als Excel-Tabelle als auch als Diagramme ausgegeben, die die Ladung, Länge und GRAVY-Werte adsorbiert und nicht adsorbiert Peptide visualisieren.

Durch den Einsatz des Skripts reduzierte sich die Dauer der Auswertung von mehreren Stunden bei manueller Durchführung auf wenige Minuten. Für die Polypropylen-Gefäße des Herstellers A ist in Abbildung 21 ein exemplarisches Ergebnis nach Ausführung des Python-Skripts dargestellt, wobei die FDR-Korrektur zur Vergleichbarkeit mit den zuvor gezeigten Ergebnissen ausgeschaltet wurde ($\text{FDR} < 1$).

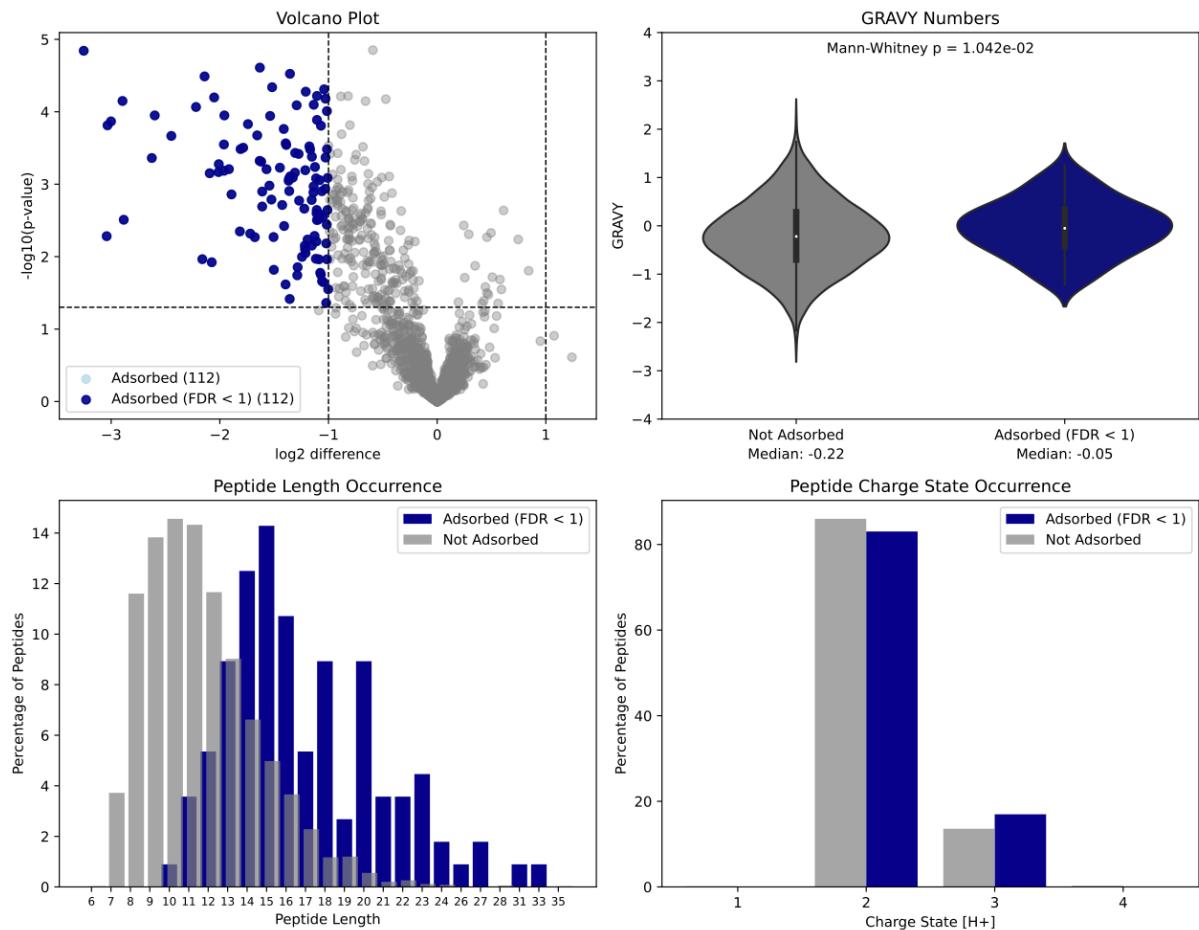


Abbildung 21: Beispielhafte APS-Assay-Ergebnisse für PP-Gefäße von Hersteller A. Oben links: Volcano-Plot basierend auf den Ergebnissen des Welch's *t*-Tests. Signifikant adsorbierte Peptide sind dunkelblau (p -Wert $< 0,05$ und \log_2 -Fold-Change ≤ -1). Oben rechts: Violin-Plots der GRAVY-Werte von adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden mit Mann-Whitney-*U* p -Wert. Unten links: Anteil vorhandener Peptidlängen bei adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden in Prozent. Unten rechts: Anteil der jeweiligen Peptidladungen bei adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden in Prozent. Basierend auf 3.531 Peptiden und je 5 Replikaten. Erstellt mit dem APS-Assay-Skript.

Das APS-Skript ermöglicht somit einen automatisierten und beschleunigten Auswerteprozess, der eine Beurteilung über die Stärke der Adsorption an die Oberfläche in einem definierten Lösungsmittel und der Ursachen für die Adsorption zulässt.

Der vollständige Code ist im Anhang 10.2. dokumentiert sowie im Forschungsdatenrepository der Universität Hamburg hinterlegt (DOI: 10.25592/uhhfdm.18057).

6.2.2. Testung von Autosampler-geeigneten Gefäßen

Im Rahmen der Entwicklung des APS-Assays konnte gezeigt werden, dass die Lagerung der Peptide in 0,1 % FA in G-Gefäßen zu einer starken Adsorption führte. Der Einsatz alternativer Gefäße, beispielsweise m-G-Gefäße, führte zu keiner signifikanten Reduktion der Adsorption.

Daher wurden spezielle Mikrotiterplatten aus modifiziertem Polypropylen (m-PP-Platte, Hersteller A) hinsichtlich ihrer Adsorptionseigenschaften mit dem APS-Assays untersucht und mit herkömmlichen PP-Platten verglichen.

Die Messung erfolgte auf einem Massenspektrometer mit deutlich höherer Messgeschwindigkeit und Sensitivität, zur Erreichung einer höheren Anzahl von Peptiden, sowie Messung niedriger abunbanter Peptide nach Inkubation. Dadurch erhöhte sich die Anzahl der zur Auswertung herangezogenen Peptide deutlich (7.903 Peptide).

Abbildung 22 zeigt die Hauptkomponentenanalyse (PCA) der APS-Ergebnisse. Während die m-PP-Platten nur minimale Unterschiede zwischen der 0 h- und 24 h-Inkubation aufweisen, zeigen die PP-Platten eine deutliche Trennung entlang der ersten Hauptkomponente (PC1), die 81 % der Gesamtvarianz erklärt.

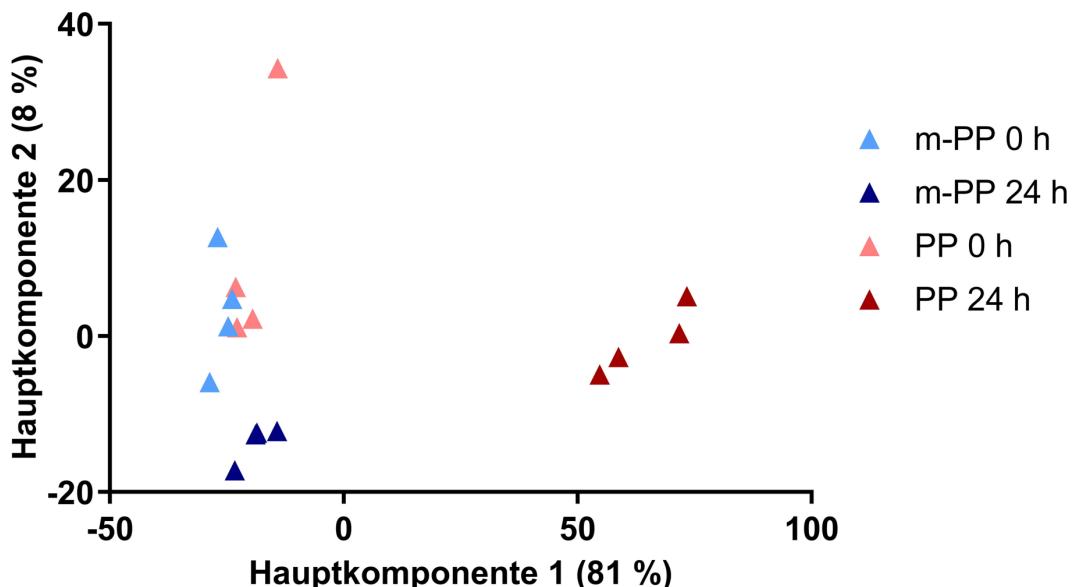


Abbildung 22: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der APS-Ergebnisse zum Vergleich von modifizierten Polypropylen-Platten (m-PP, Hersteller A) mit herkömmlichen PP-Platten. Entlang der ersten Hauptkomponente (PC1, 81 % Varianzaufklärung) zeigt sich eine deutliche Trennung zwischen den m-PP-Platten und den nach 24 h Inkubation in klassischen PP-Platten. Basierend auf 7.903 Peptiden und je 4 Replikaten.

Nach Anwendung des APS-Assay-Skripts (Anhang Abbildung A1 und A2) konnten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Platten (PP und m-PP) festgestellt werden. PP-Platten adsorbierten 1.071 Peptide während m-PP Platten nur 6 Peptide (p-Werte (FDR-korrigiert) $< 0,1$ und \log_2 -Fold-Change < -1) adsorbierten. Die Adsorption ist, wie zuvor schon bei 1,5-mL-Gefäß m-PP gezeigt, durch hydrophobe Wechselwirkungen verursacht, da der GRAVY-Wert im Median einen Unterschied von +0,35 für adsorbierte Peptide aufwies.

Interessanterweise waren einige Peptide bei beiden Platten nach Inkubation höher abundant. Bei m-PP-Platten waren diese Peptide jedoch nicht FDR-signifikant (q-Wert $< 0,1$). Bei der PP-

Platte hingegen waren insgesamt 38 Peptide signifikant höher abundant nach der Inkubation. Die Peptide sind durchschnittlich nur 10 Aminosäuren lang, sehr hydrophil mit einem mittleren GRAVY-Wert von -0,83 und dreifach positiv geladen.

Die Peptidabundanzen für den APS-Assay (Tabelle S3), die APS-Ergebnisse von PP (Tabelle S4) und die Ergebnisse für m-PP (Tabelle S5) sind über das Forschungsdatenrepository der Universität Hamburg verfügbar (DOI: 10.25592/uhhfdm.18057).

6.2.3. Anwendung des optimierten APS-Assays

Durch die Testung der m-PP-Platten, die für den direkten Einsatz im Autosampler geeignet sind und nahezu keine Adsorption aufweisen, wurde der Ablauf der APS-Assays verändert und vereinfacht. Statt der nacheinander erfolgenden Inkubation und Messung, die die Testung auf eine geringe Anzahl von Replikaten und Oberflächen begrenzt, ist nun nach erfolgter Inkubation in den Gefäßen eine Lagerung in der m-PP-Platte bis zur Messung möglich. Aus dieser werden dann automatisiert die Proben im Autosampler injiziert.

Auf Basis dieses Aufbaus wurden die 1,5-mL-Gefäße aus m-PP und PP von Hersteller A erneut mittels APS-Assay nach Inkubation in 0,1 % FA in Wasser getestet, wobei auch nur noch eine 0 h-Kontrolle für beide Gefäßtypen gemessen wurde. Die Ergebnisse der Messung sind in der Hauptkomponentenanalyse in Abbildung 23 dargestellt.

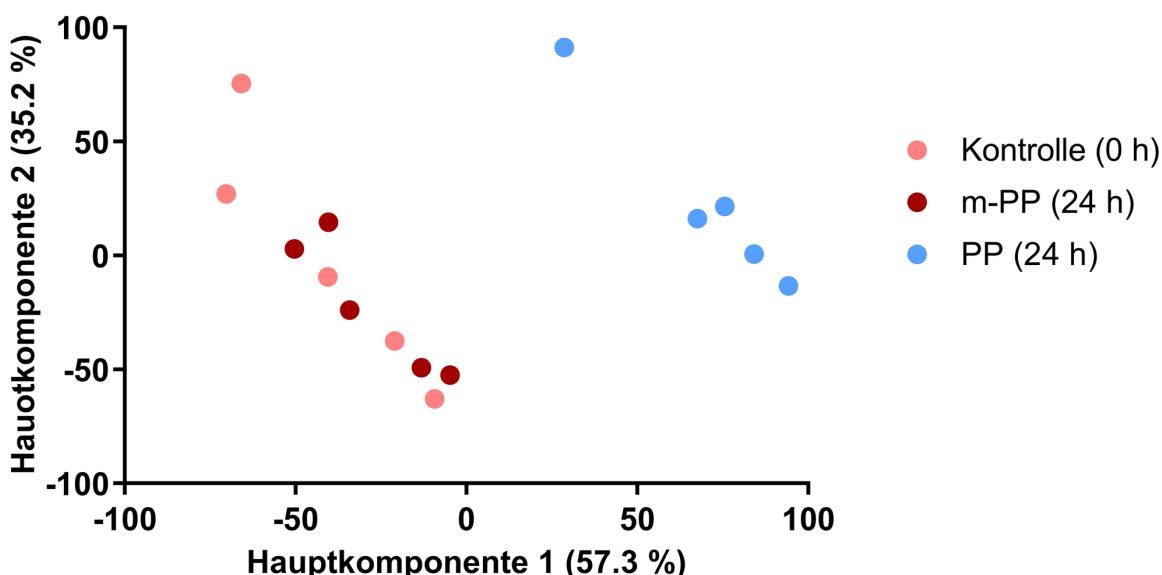


Abbildung 23: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der APS-Ergebnisse zum Vergleich von 1,5 mL m-PP- und PP-Gefäßen von Hersteller A. Die Proben wurden direkt in den Gefäßen inkubiert und anschließend in m-PP-Platten überführt, aus denen die automatische Injektion im Autosampler erfolgte. Entlang der ersten Hauptkomponente (PC1) zeigt sich eine deutliche Trennung zwischen m-PP- und klassischen PP-Gefäßen. Die Analyse basiert auf 18.138 Peptiden und je 5 Replikaten.

Basierend auf Hauptkomponente 1, die 57,3 % der Varianz erklärt, können 2 große Cluster beobachtet werden. Das eine Cluster wird durch die 0 h-Kontrollen zusammen mit den

Replikaten der für 24 Stunden inkubierten Proben im 1,5-mL-m-PP-Gefäß gebildet. Das zweite Cluster, das sich eindeutig abgrenzt, besteht aus den technischen Replikaten der 1,5-mL-PP-Gefäße. Entlang der Hauptkomponente 2 lässt sich eine leichte, aber nicht für alle Proben eindeutige Verschiebung der Peptidabundanzen nach Zeitpunkt der Injektion beobachten.

Im Anschluss an die Datenbanksuche, erfolgte die Auswertung mit dem APS-Assay-Skript. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 und 25 dargestellt.

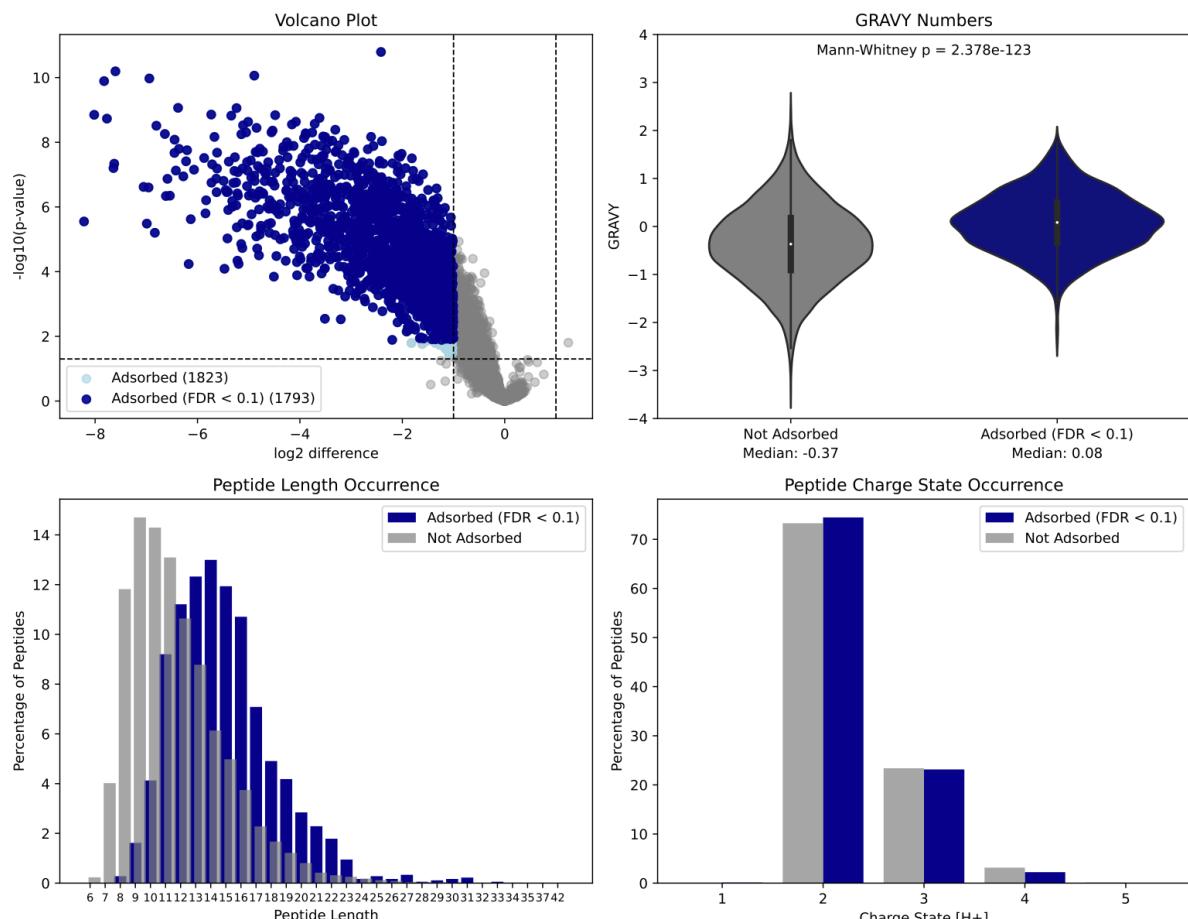


Abbildung 24: APS-Assay-Ergebnisse der 1,5-mL-PP-Gefäße von Hersteller A nach Messung aus m-PP-Platte. Oben links: Volcano-Plot basierend auf den Ergebnissen des Welch's t -Tests. Signifikant adsorbierte Peptide sind hellblau (p -Wert $< 0,05$ und \log_2 -Fold-Change ≤ -1) oder dunkelblau (zusätzlich FDR -signifikant, q -Wert $< 0,1$). Oben rechts: Violin-Plots der GRAVY-Werte von adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden mit Mann-Whitney-U p -Wert. Unten links: Anteil vorhandener Peptidlängen bei adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden in Prozent. Unten rechts: Anteil der jeweiligen Peptidladungen bei adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden in Prozent. Basierend auf 18.138 Peptiden und je 5 Replikaten. Erstellt mit dem APS-Assay-Skript.

Insgesamt wurden Abundanzen von 18.138 Peptiden in allen Replikaten gemessen, statt 3.531 bei der Entwicklung des APS-Assays. In der Abbildung 24 ist nach der Inkubation eine starke Adsorption der Peptide an PP-Gefäße von Hersteller A zu sehen. Es wurden 1.793 Peptide adsorbiert (1.823 p-Wert-signifikant). Im Vergleich zu den während der Entwicklung des APS-Assays gezeigten Ergebnissen für die Gefäße aus PP von Hersteller A ist dies eine deutlich größere Anzahl adsorbiertener Peptide (112). Während der mediane GRAVY-Wert nicht-adsorbiertener Peptide -0,37 betrug, lag er bei adsorbierten Peptiden bei 0,08 (p -Wert $< 0,0001$).

Dies deutet auf hydrophobe Wechselwirkungen hin. Zusätzlich wiesen adsorbierte Peptide eine deutlich sichtbare Verschiebung der Peptidlänge auf. Statt bei 9 Aminosäuren lag die am häufigsten in der adsorbierten Kohorte vorkommende Länge bei 14 Aminosäuren. Bezuglich der Ladung der Peptide konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Auch für die m-PP-Gefäße wurde das APS-Assay-Skript genutzt (Abbildung 25), um die Adsorption zu quantifizieren und die adsorbierten Peptide zu charakterisieren.

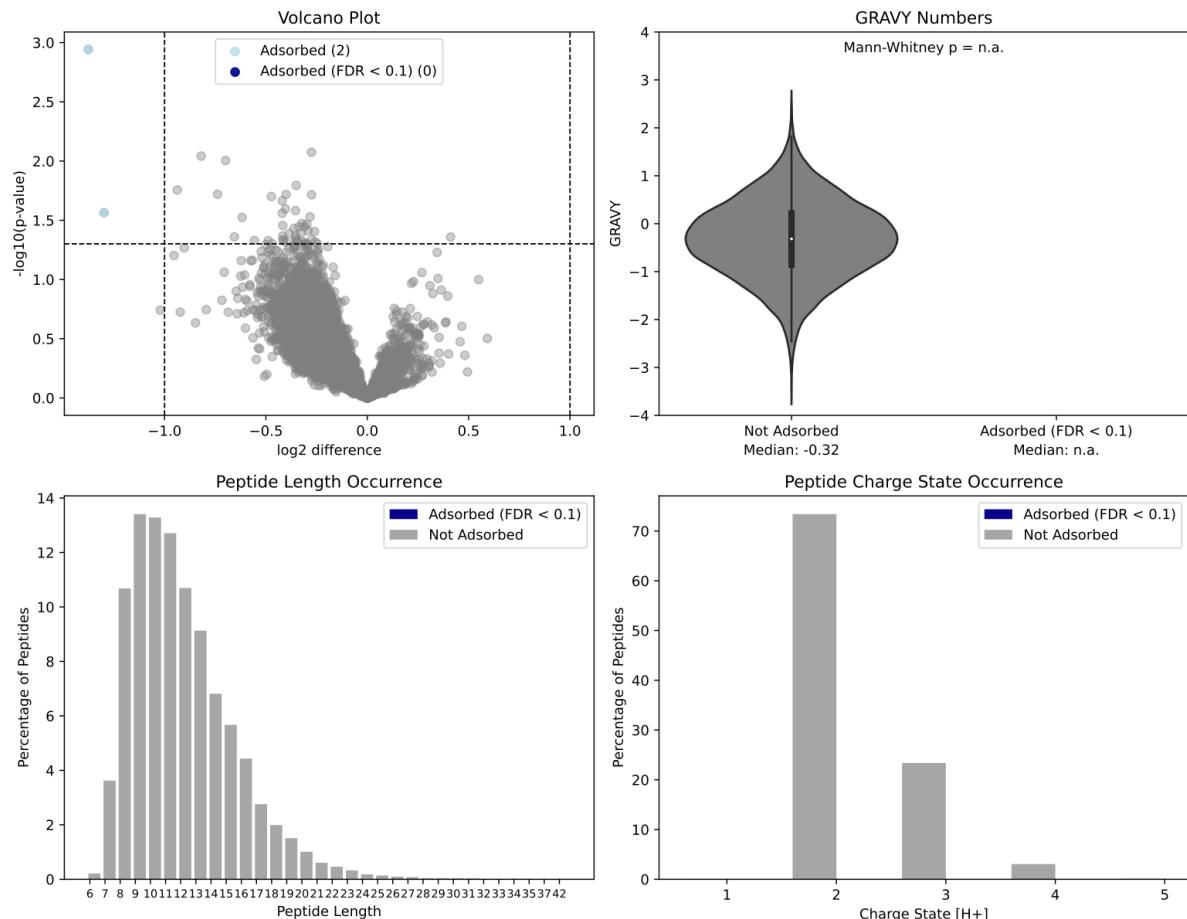


Abbildung 25: APS-Assay-Ergebnisse der 1,5-mL-m-PP-Gefäße von Hersteller A nach Messung aus m-PP-Platte. Oben links: Volcano-Plot basierend auf den Ergebnissen des Welch's t-Tests. Signifikant adsorbierte Peptide sind hellblau ($p\text{-Wert} < 0,05$ und $\log_2\text{-Fold-Change} \leq -1$) oder dunkelblau (zusätzlich FDR-signifikant, $q\text{-Wert} < 0,1$). Oben rechts: Violin-Plots der GRAVY-Werte von adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden mit Mann-Whitney-U $p\text{-Wert}$. Unten links: Anteil vorhandener Peptidlängen bei adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden in Prozent. Unten rechts: Anteil der jeweiligen Peptilladungen bei adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden in Prozent. Basierend auf 18.138 Peptiden und je 5 Replikaten. Erstellt mit dem APS-Assay-Skript.

Nach Inkubation in den m-PP-Gefäßen konnten mit dem APS-Assay keine signifikant veränderten Peptide identifiziert werden (0 mit $\text{FDR} < 0,1$ bzw. 2 mit $p\text{-Wert} < 0,05$ und $\log_2\text{-Fold-Change} \leq -1$).

Die Peptidabundanzen für den APS-Assay (Tabelle S6), die APS-Ergebnisse von PP (Tabelle S7) und die Ergebnisse für m-PP (Tabelle S8) sind im Forschungsdatenrepository der Universität Hamburg verfügbar (DOI: 10.25592/uhhfdm.18057).

6.3. Auswirkung der Peptidadsorption auf Proteomik-Projekte

Bottom-up-basierte Proteomik-Projekte zielen darauf ab, relative Unterschiede in der Proteinabundanz zwischen verschiedenen experimentellen Bedingungen zu analysieren. Unvorhergesehene oder methodisch bedingte Veränderungen der Proben stellen daher ein erhebliches Risiko für die Aussagekraft der anschließenden Datenanalyse dar. Auf Basis der zuvor in Kapitel 6.2.3. gezeigten Ergebnisse von PP-Gefäßen des Herstellers A, die eine starke Adsorption des HeLa-Peptidstandards nach 24-stündiger Inkubation in 0,1 % FA in Wasser aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zeigten, wurde ein möglicher Einfluss auf Proteinabundanzen innerhalb eines typischen Proteomik-Experiments simuliert und die Auswirkungen auf das Analyseergebnis dargestellt.

6.3.1. Einfluss der Peptid-Adsorption auf die Proteinabundanzen

Zur Simulation einer klassischen Bottom-up-Proteomanalyse wurden die Peptidabundanzen zunächst auf eindeutige (*unique*), unmodifizierte und in allen Proben vorkommende Peptide reduziert. Anschließend wurden Proteinabundanzen nur für jene Proteine berechnet, für die mindestens zwei einzigartige Peptide (≥ 2 *unique* Peptide pro Protein) vorlagen. Die resultierende Proteindatenmatrix umfasste 2.592 Proteine. Sie bildete die Grundlage für eine relative Quantifizierung der Proteine und Demonstration der Auswirkungen von Adsorption auf eine Proteomanalyse.

In Abbildung 26 sind die signifikant veränderten Proteine in einem Volcano-Plot dargestellt. Als Schwellenwert wurde eine mindestens 1,5-fach verminderte Abundanz sowie eine FDR $< 0,1$ festgelegt. Die Ergebnisse der signifikant veränderten Proteine sind zusätzlich in Tabelle A4 dargestellt, alle weiteren Proteine sind im Forschungsdatenrepositorium der Universität Hamburg verfügbar (Tabelle S9, DOI: 10.25592/uhhfdm.18057).

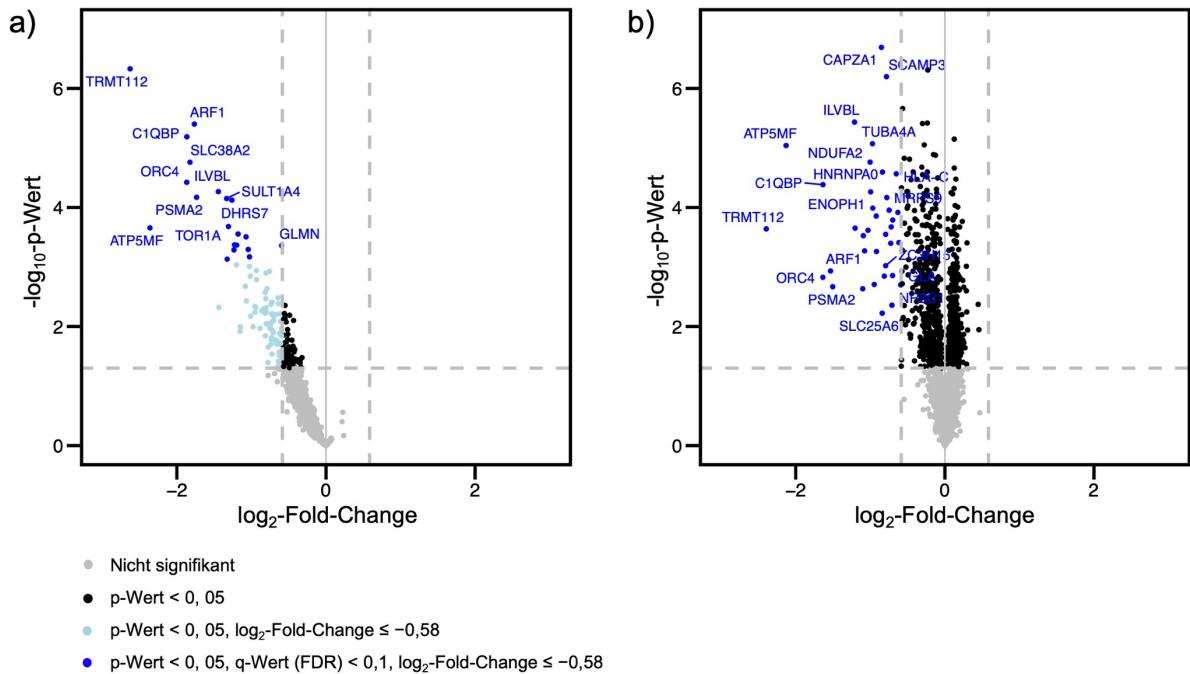


Abbildung 26: Volcano-Plot der differentiell quantifizierten Proteine nach Inkubation in PP-Gefäßen von Hersteller A. a) nicht-normalisierte Daten, b) Spalten-Median-normalisierte Daten. Signifikante Veränderungen sind definiert als p-Wert < 0,05, q-Wert (FDR) < 0,1, log₂-Fold-Change ≤ -0,58. Basierend auf 2.592 Proteinen.

Wie in Abbildung 25 a sichtbar, führte die 24-stündige Inkubation der Peptide zu einer Veränderung der Proteinabundanzen. Auch nach Normalisierung der Proteinabundanzen auf den Spaltenmedian (Abbildung 25 b) blieb die adsorptionsbedingte Verschiebung der Abundanzen bestehen. In Abbildung 27 sind die vier am stärksten veränderten Proteine und ihre Abundanz innerhalb der Replikate der 0 h Kontrolle sowie den 24 Stunden inkubierten PP- und m-PP-Gefäßen dargestellt.

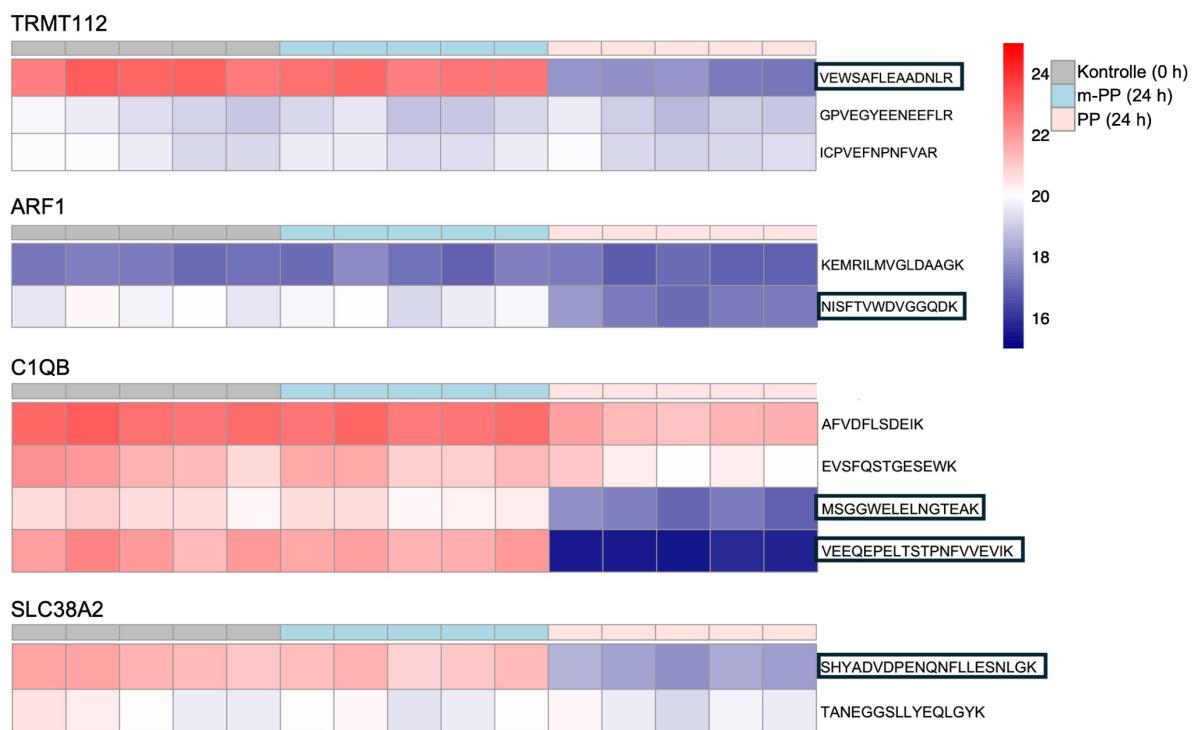


Abbildung 27: Top 4 adsorbierte Proteine und ihre Peptide. Heatmap-Darstellung der Peptidabundanzen über alle Replikate und Bedingungen (0 h, 24 h: PP, m-PP). Signifikant adsorbierte Peptide sind mit schwarzen Kästen markiert.

Das am stärksten von Adsorption betroffene Protein war TRMT112 (*Multifunctional methyltransferase subunit TRM112-like protein*), das über drei Peptide quantifiziert wurde. Besonders das Peptid VEWSAFLEAADNLR zeigte eine starke Adsorption an die Oberfläche des PP-Gefäßes und führte somit zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtabundanz des Proteins. Auch bei den Proteinen ARF1 (*ADP-ribosylation factor 1*) und SLC38A2 (*Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2*) war jeweils ein einzelnes Peptid (NISFTVWDVGGQDK bzw. SHYADVPENQNLLESNLGK) für die beobachtete Abundanzveränderung verantwortlich. Für das Protein C1QB (*Complement C1q subcomponent subunit B*) konnten hingegen zwei stark betroffene Peptide identifiziert werden, die gemeinsam eine deutliche Abnahme der Proteinabundanz nach 24-stündiger Inkubation verursachten.

Für die oben genannten Proteine zeigte sich, dass die Adsorption einzelner Peptide zu signifikanten Veränderungen in der Proteinabundanz führte. Dies trifft besonders zu, wenn nur wenige Peptide pro Protein zur Quantifizierung herangezogen werden können. Zum Vergleich, die Adsorption von Peptid SINPDEAVYYGAAVQAAILSGDK aus dem Protein HSPA8, führte nicht zu einer Veränderung der Proteinabundanz (Abbildung A3), da 13 weitere Peptid aus dem Protein nicht adsorbiert waren.

6.3.2. Einfluss der Adsorption auf Gene-Set-Enrichment-Analysen.

Eine besonders häufig genutzte Methode zur Analyse von Proteomdaten ist die Gene-Set-Enrichment-Analyse (GSEA) (Subramanian et al., 2005). Dabei werden Proteine entsprechend ihrer \log_2 -Fold-Change-Werte geordnet und anschließend auf Überlappungen mit kuratierten Gensets aus öffentlichen Datenbanken untersucht. Ziel ist die Identifikation biologischer Prozesse, molekularer Funktionen oder zellulärer Komponenten bzw. biologischer Signalwege (*Pathways*), die systematisch durch die beobachteten Veränderungen beeinflusst werden. Diese Methode ermöglicht es, komplexe Proteom-Datensätze biologisch zu interpretieren, indem sie Zusammenhänge zwischen differentiell exprimierten Proteinen und bekannten Signalwegen oder Zelfunktionen visualisiert. GSEA stellt somit ein zentrales Werkzeug dar, um aus umfangreichen Proteomdaten biologisch relevante Schlussfolgerungen zu ziehen.

Als Genset-Datenbank wurde die KEGG-Datenbank (Kanehisa & Goto, 2000) genutzt. In Abbildung 28 ist eine GSEA dargestellt, die auf den durch Adsorption an PP-Oberflächen veränderten Proteinabundanzen (\log_2 -Fold-Changes aus dem Welch's t-Test) basiert.

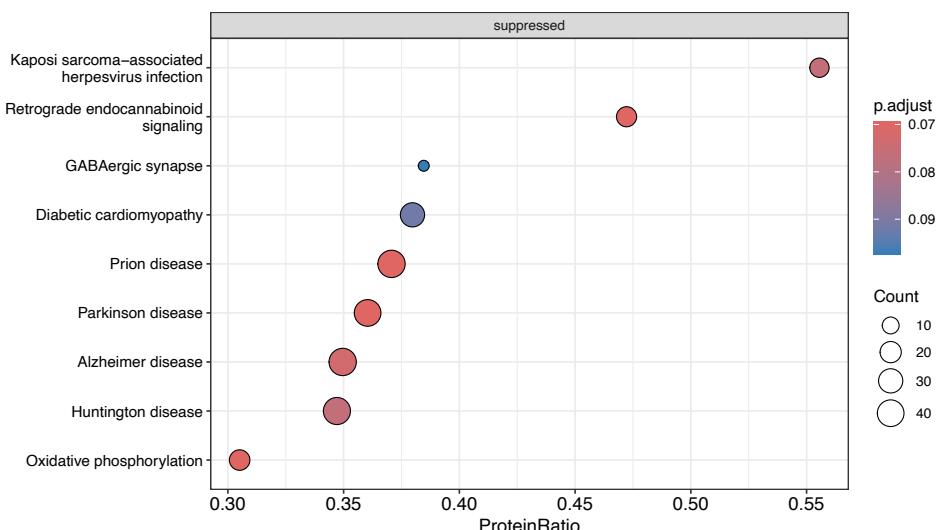


Abbildung 28: Bubble-Plot der KEGG-basierten GSEA nach 24-stündiger Inkubation in PP-Gefäßen. Auf der x-Achse ist die ProteinRatio dargestellt, d. h. der Anteil der Proteine aus der untersuchten Liste, die in einem bestimmten KEGG-Signalweg vorkommen, relativ zur Gesamtzahl der Proteine in diesem Signalweg. Die Größe der Kreise entspricht der absoluten Anzahl der Proteine aus der Liste, die dem jeweiligen Signalweg zugeordnet sind (Count). Die Farbe der Kreise repräsentiert den adjustierten p-Wert (Benjamini-Hochberg-Korrektur), wobei dunklere Farben eine höhere statistische Signifikanz anzeigen.

Die KEGG-basierte GSEA zeigte eine signifikante Suppression für mehrere Gensets in den 24 Stunden inkubierten PP-Gefäßen. Das Genset mit der größten Anreicherung (Enrichment) an Proteinen (ProteinRatio), war *Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection*. Die Proteine, die sich hinter diesem Term verbergen sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Genset Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection aus der KEGG-basierten GSEA-Analyse. Für jedes Protein sind *p*-Wert, *q*-Wert (adjustierter *p*-Wert) und \log_2 -Fold-Change nach 24 h Inkubation in PP-Gefäßen angegeben.

Genname	p-Wert	q-Wert	log2-Fold-Change
GNB1	0,0287	0,6618	-0,5498
GNB2	0,02936	0,6618	-0,5716
HLA-C	0,01074	0,3944	-0,8834
ATG3	0,0377	0,7186	-0,5407

Das Enrichment des Gensets beruht auf vier Proteinen, die im vorliegenden Datensatz einen *p*-Wert kleiner 0,05 zeigten, sowie eine \log_2 -Fold-Change $< -0,54$, also eine Reduktion um mindestens das 1,3-fache. Die Gene GNB1 (*Guanine nucleotide-binding protein beta-1 subunit*) und GNB2 (*Guanine nucleotide-binding protein beta-2 subunit*) codieren für die β -Untereinheiten von heterotrimeren G-Proteinen (Oldham & Hamm, 2008). Die Peptide, die für Adsorption verantwortlich sind, haben die Sequenz ACADATLSQITNNIDPVGR (GNB1) und ACGDSTLTQITAGLDPVGR (GNB2). Die Peptide haben beide eine Länge von 19 Aminosäuren, wobei 13 Aminosäuren identisch sind. Weitere sind konservativ ausgetauscht (z. B. Leu \leftrightarrow Ile, Ser \leftrightarrow Thr). Diese starke Konservierung legt nahe, dass strukturelle und physikochemische Eigenschaften der Peptide eine gemeinsame Ursache für die beobachtete Adsorption darstellen.

Zusätzlich wurden in der GSEA mehrere Gensets aus dem Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen signifikant angereichert. Dazu zählten unter anderem *Prion disease*, *Parkinson disease*, *Alzheimer disease* und *Huntington disease*. Trotz dieser inhaltlichen Nähe handelt es sich bei den in den jeweiligen Gensets angereicherten Proteinen nicht um die typischen pathogenen, neuronalen, Aggregationsproteine wie z. B. β -Amyloid (Baker et al., 1994), α -Synuclein (Braak et al., 2003) oder Huntingtin (Graveland et al., 1985), die in HeLa-Zellen nicht oder in niedrigen Mengen vorzufinden sind. Stattdessen wurden gehören diese Proteine zu den Gensets, die indirekt mit neurodegenerativen Signalwegen assoziiert sind. In Tabelle 14 sind exemplarisch die im untersuchten Datensatz enthaltenen Proteine aus dem Gene-Set *Prion disease* aufgelistet.

Tabelle 14: Genset „Prion Disease“ aus der KEGG-basierten GSEA-Analyse. Für jedes Protein sind p-Wert, q-Wert (adjustierter p-Wert) und \log_2 -Fold-Change der Abundanz nach 24 h Inkubation in PP-Gefäßen angegeben.

Genname	p-Wert	q-Wert	\log_2 -Fold-Change
COX7A2	0,0042	0,3052	-0,7376
CSNK2A1	0,0108	0,3944	-0,5999
TUBB	0,0298	0,6651	-0,5363
SLC25A5	0,0013	0,1312	-0,8050
SLC25A6	0,0003	0,0622	-1,0724
NDUFA2	0,0005	0,0746	-1,2341
NDUFA8	0,0457	0,7661	-0,4558
NDUFB5	0,0046	0,3056	-0,9573
NDUFS3	0,0351	0,6989	-0,4159
NDUFS4	0,0369	0,7145	-0,3481
ATP5F1B	0,0223	0,5826	-0,4781
NDUFB11	0,0048	0,3056	-1,356
PSMA2	0,0001	0,0217	-1,7352
PSMB2	0,0369	0,7145	-0,4818
TUBA4A	0,0009	0,1139	-1,2022

Das am stärksten in seiner Gesamtabundanz veränderte Protein ist PSMA2 (*Proteasome subunit alpha type-2*) mit einer \log_2 -Fold-Change von -1,7. PSMA2 ist Bestandteil des 20S-Proteasomkomplexes, der eine zentrale Rolle bei der proteolytischen Degradation von ubiquitinierten Proteinen spielt (Tamura et al., 1991). Für PSMA2 wurden zwei Peptide identifiziert, die im APS-Assay eine starke Adsorption zeigten: GYSFSLTTFSPSGK und LVQIEYALAAVAGGAPSVDIK. Besonders das zweite Peptid mit einer Länge von 21 Aminosäuren weist einen hohen GRAVY-Wert von +1,07 auf, was auf eine ausgeprägte Hydrophobizität hinweist. Auch das Protein PSMB2 (*Proteasome subunit beta type-2*) weist eine niedrigere Abundanz nach Inkubation auf, wobei das verantwortliche Peptid FILNLPTFSVR einen hohen GRAVY-Wert von +0,98 hat.

Zusätzlich ist auch in diesem Genset wieder eine Häufung von Proteinen mit Sequenzähnlichkeiten zu sehen. So sind beispielsweise von den membranassoziierten, mitochondrialen Proteinen SLC25A5 und SLC25A6 (Yang et al., 2010) jeweils ein hydrophobes Peptid adsorbiert worden (DFLAGGIAAAISK, GRAVY: 1,1 und DFLAGGVAAAISK, GRAVY: 1,03), die sich in ihrer Sequenz nur an Position 7 unterscheiden (Val ↔ Ile).

Die Proteine NDUFA2, NDUFA8, NDUFB5, NDUFS3, NDUFS4 und NDUFB11 gehören alle zur mitochondrialen Atmungskette, genauer gesagt zum Komplex I (*NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase*) der mitochondrialen Elektronentransportkette (Smeitink et al., 2001). Anders als bei SLC25A5/6 liegen die Gründe für die Adsorption der Peptide aber nicht ihrer

Sequenzhomologie. Der Komplex 1 besteht aus insgesamt 45 Untereinheiten, die sich in dem L-förmigen Komplex auf einen Matrixarm und einen Membran-eingebetteten Arm verteilen (Dang et al., 2020). Das Protein mit der höchsten log₂-Fold-Change war NDUFB11. Das verantwortliche Peptid hat die Sequenz RPPEPTTPWQEDPEPEDENLYEK ist also sehr lang und hat einen GRAVY-Wert von -2,3. Auch das Peptid, dass für die Signifikanz des Proteins NDUFA2 verantwortlich ist, YAFGQETNVPLNNFSADQVTR ist sehr hydrophil (GRAVY: -0,62). Interessanterweise sind jedoch beide Peptide deutlich länger als der Durchschnitt mit 23 und 21 Aminosäuren, was auf einen Einfluss durch eine Sekundärstruktur hinweist, auf die im Verlauf der Arbeit weiter eingegangen wird.

6.4. Entwicklung des Tandem-Quadrupol-MS-basierten *Fast-Assays*

Der APS-Assay ermöglicht eine umfassende, LC-MS/MS-basierte Analyse der Wechselwirkungen zahlreicher Analyten mit Oberflächen. Obwohl diese Methode für eine detaillierte Charakterisierung äußerst empfehlenswert ist, gibt es Anwendungsszenarien, in denen gezielt eine bestimmte Wechselwirkung untersucht werden soll – beispielsweise im Hinblick auf die Effekte verschiedener Lösungsmittel. Solche Studien erfordern oft eine Vielzahl an Messungen, insbesondere bei kinetischen Fragestellungen, was aufgrund der chromatographischen Trennungen in der bisherigen Methode mit einem erheblichen Zeitaufwand (≥ 1 Stunde pro Probe) verbunden ist.

Um eine schnellere Testung hydrophober Wechselwirkungen zu ermöglichen, wurde daher der *Fast-Assay* auf Basis eines Tandem-Quadrupol-Massenspektrometers mit einer MRM-Methode entwickelt.

6.4.1. Auswahl geeigneter Peptide

Die Peptide, die für diesen Assay genutzt werden sollten, wurden basierend auf dem bestehenden Pool an analysierten Peptiden aus der Entwicklung des APS-Assays ausgewählt. Dabei wurde zunächst geprüft, welches Peptid die stärkste Adsorption zu allen drei PP-Materialien zeigte.

Das Peptid SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK zeigte die stärkste Adsorption an alle drei PP-Gefäße bei einem GRAVY-Wert von 0,23 und wurde deshalb zu weiterer Entwicklung eines schnellen Assays als hydrophobes Peptid genutzt. Als Kontrolle wurde zusätzlich ein Peptid gewählt, das nicht adsorbiert wurde und einen besonders niedrigen GRAVY-Wert aufweist (DGETPDPEDPSRK, GRAVY: -2,5) und als hydrophiles Gegenstück genutzt.

6.4.2. Entwicklung einer Tandem-Quadrupol-basierten MS-Methode

Zur Überprüfung der synthetisierten Peptide wurden zunächst LC-MS-Messungen durchgeführt, um die korrekten monoisotopischen Massen zu bestätigen (Abbildung A4). Das Peptid SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK wurde überwiegend im dreifach positiv geladenen Zustand detektiert (m/z 754,2, $z = 3$), entsprechend einer Masse von 2259,6 Da (monoisotopische Masse: 2259,1 Da). Auch das hydrophile Peptid DGETPDPEDPSRK lag überwiegend im dreifach protonierten Zustand vor, mit einem m/z von 481,6 ($z = 3$). Dies entspricht einer Masse von 1441,8 Da (monoisotopische Masse: 1441,6 Da). Die hohen

Massenabweichungen zwischen der berechneten und gemessenen Masse der Peptide ergeben sich durch die niedrige Massenauflösung und -genauigkeit des TQ-MS.

Anschließend wurden geeignete Fragmentierungsenergien sowie passende *Quantifier*- und *Qualifier*-Ionen identifiziert (siehe Kapitel 5.7.5.), die für die gezielte Detektion und relative Quantifizierung der Peptide in Adsorptionsversuchen eingesetzt wurden. In Abbildung 29 ist exemplarisch das Chromatogramm mit den drei Übergängen zur Quantifizierung des hydrophoben Peptids dargestellt.

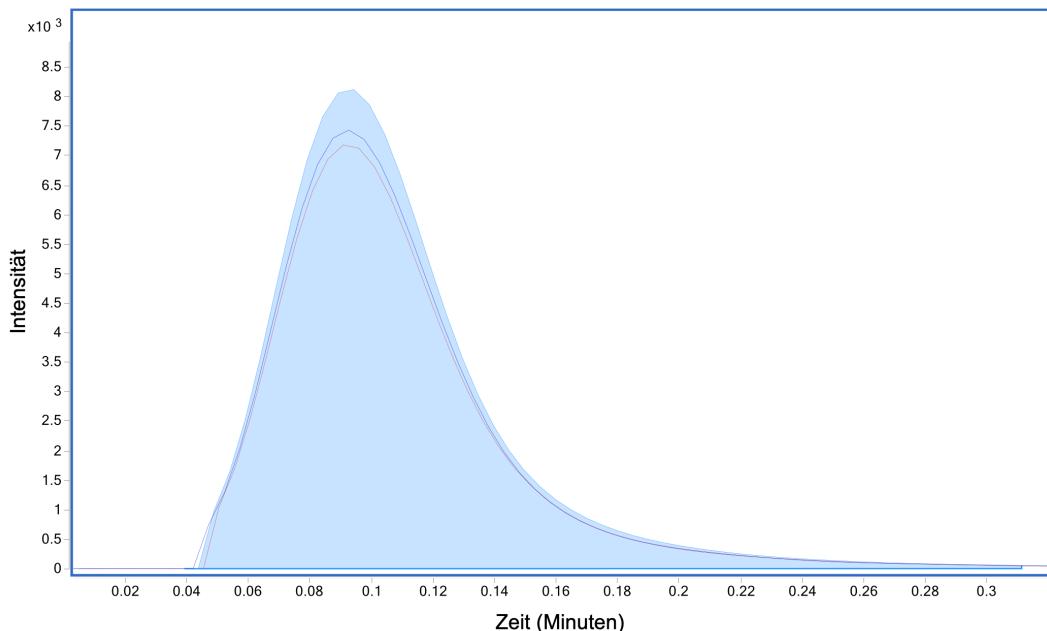


Abbildung 29: Chromatogramm der TQ-MS-basierten MRM-Messung des hydrophoben Peptids. Dargestellt ist das Chromatogramm des hydrophoben Peptids (SINPDEAVYYGAAVQAAILSGDK) mit dem Quantifier (hellblau), und den beiden Qualifiern (dunkelblau, rot) nach Messung bei einer Konzentration von 1000 nM. Für den Quantifier ist die AUC markiert.

Über die Integration der Fläche unter der Kurve (AUC) vom jeweiligen *Quantifier*, wurden die Peptidabundanzen in den folgenden Messungen bestimmt. Zur Validierung der Methode wurde eine Kalibriergerade über einen Konzentrationsbereich von 10 bis 1000 nM angefertigt (Abbildung 30).

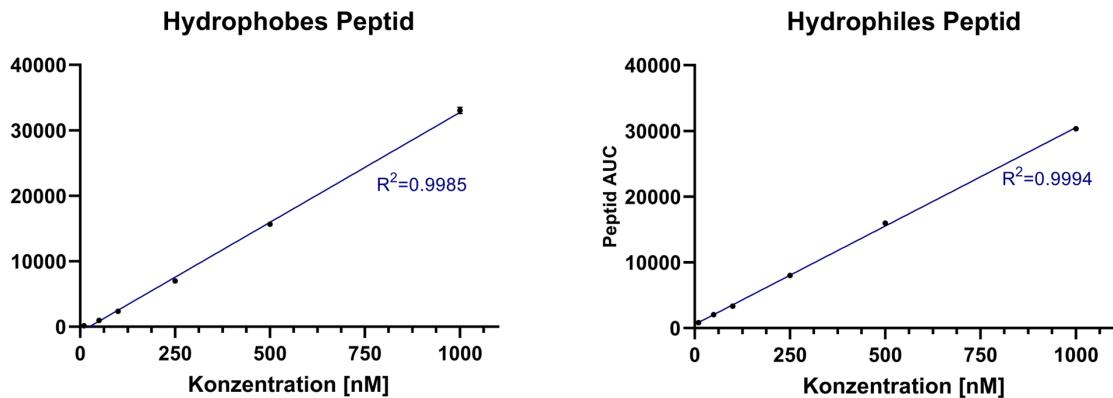


Abbildung 30: Kalibriergeraden des hydrophoben und hydrophilen Peptids auf dem Tandem-Quadrupol-MS. Für jede Peptidkonzentration (10, 50, 100, 250, 500 und 1000 nM) wurden drei Messungen durchgeführt und die Mittelwerte gebildet. Die Signalintensitäten der Quantifier-Ionen zeigen eine hohe Linearität, mit Bestimmtheitsmaßen (R^2) > 0,99 für beide Peptide (hydrophob: SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK, hydrophil: DGETPDPEPEDPSRK).

Für jede Konzentration wurden drei Messungen durchgeführt, aus denen die Mittelwerte gebildet wurden. Die berechneten Bestimmtheitsmaße (R^2) lagen für beide Peptide über 0,99, was auf eine hohe Linearität der Methode und eine zuverlässige Quantifizierbarkeit der Peptide über den Konzentrationsbereich hinweist.

Die Zeitersparnis durch die Testung eines Peptids statt der Durchführung einer Bottom-up-Proteomik-Messung, hängt auch von dem verwendeten HPLC-Gradienten ab, jedoch ist eine Reduktion um bis zu 95% der Zeit möglich, bei einer Messzeit von 2,5 Minuten pro Probe im *Fast-Assay*.

6.4.3. Kinetik zur Bestimmung des Adsorptionsverhaltens über die Zeit

Zur Untersuchung der Adsorptionskinetik wurden beide Peptide über einen Zeitraum von 11,5 h in Gefäßen aus Polypropylen (PP) sowie Glas, jeweils von Hersteller E, inkubiert. Dabei kamen zwei unterschiedliche Lösungsmittel zum Einsatz: 0,1 % Ameisensäure (FA) in Wasser, entsprechend den Bedingungen des APS-Assays, und zum anderen in 0,02 % Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) in Wasser, einem milden nichtionischen Detergens, das zuvor zur Reduktion unspezifischer Oberflächenwechselwirkungen eingesetzt wurde (Tsai et al., 2021). Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 dargestellt.

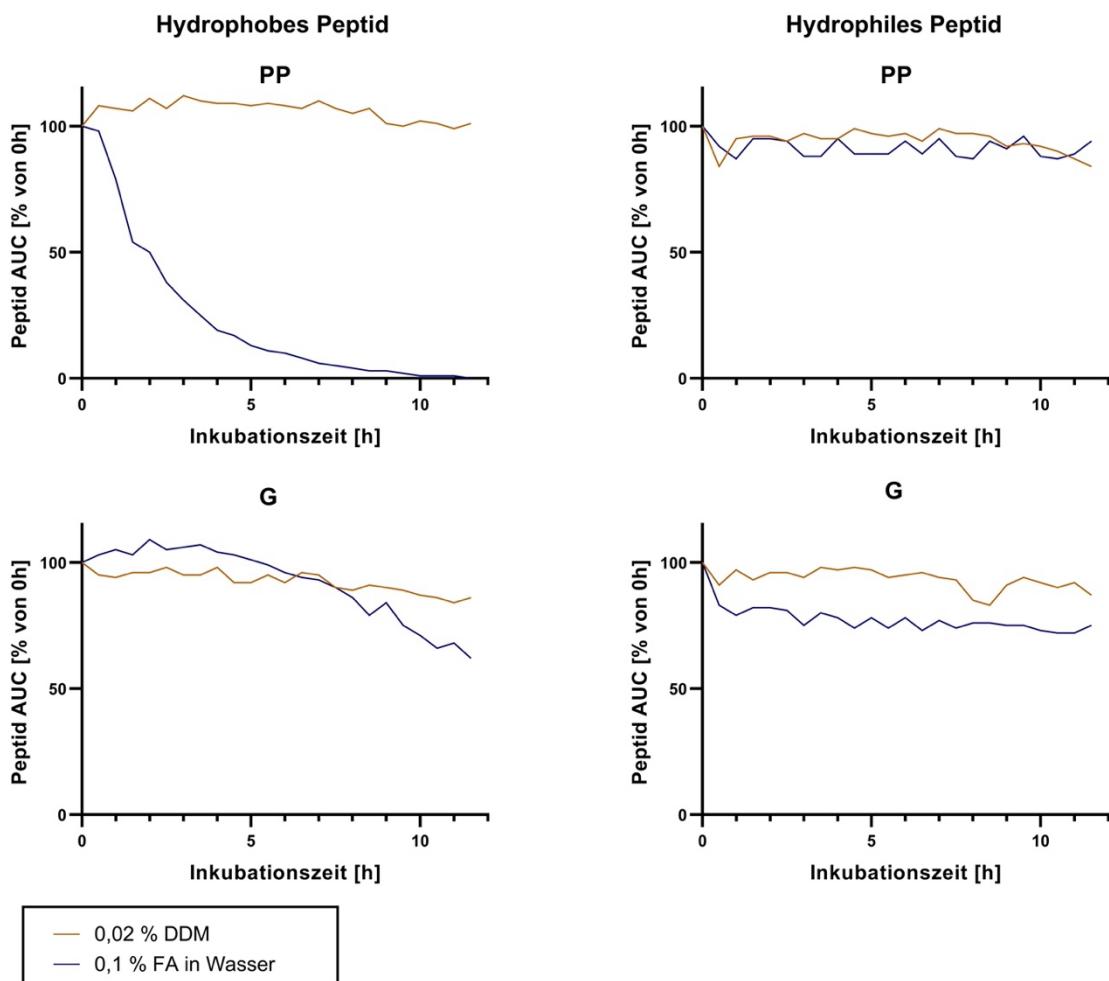


Abbildung 31: Kinetik der Peptidadsorption an Autosampler-Gefäße aus Polypropylen (PP) und Glas (G) von Hersteller E. Dargestellt sind die zeitabhängigen Messungen der Peptidabundanzen über 11,5 h in zwei unterschiedlichen Lösungsmitteln (0,1 % FA und 0,02 % DDM in Wasser) in Gefäßen aus PP und Glas. Die Abbildung zeigt den Vergleich der Adsorptionsprofile des hydrophoben (SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK) und hydrophilen (DGETPDPEDPSRK) Peptids.

Das hydrophobe Peptid (SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK) zeigte in PP eine sehr schnelle Adsorption. Bereits nach 1,5 Stunden war die detektierte Peptidmenge auf etwa 50 % des Ausgangswerts abgesunken. In Glas verlief die Adsorption hingegen deutlich langsamer und annähernd linear über den gesamten Zeitraum. Das hydrophile Kontrollpeptid (DGETPDPEDPSRK) zeigte in PP keinerlei erkennbare Adsorption. In Glas ließ sich zu Beginn ein leichter Signalabfall feststellen, der sich jedoch schnell stabilisierte, sodass die Abundanz über die restliche Zeit konstant blieb. In beiden Fällen konnte unter Verwendung von 0,02 % DDM, unabhängig vom Material (PP oder Glas), keine Adsorption festgestellt werden. Die Peptidabundanzen blieben über die gesamte Dauer der Inkubation stabil.

6.4.4. Fast-Assay zur schnellen Messung hydrophober Wechselwirkungen

Aufgrund der schnellen und deutlichen Adsorption des hydrophoben Peptids an PP-Oberflächen wurde im nächsten Schritt eine verlängerte Inkubationszeit von 24 Stunden

gewählt, um die Eignung des entwickelten Fast-Assays für den Nachweis von Adsorption zu evaluieren.

Hierzu wurden sowohl das hydrophobe als auch das hydrophile Peptid in 0,1 % FA für 24 Stunden in PP-Gefäßen des Herstellers A inkubiert. Anschließend wurde die relative Peptidabundanz vor und nach Inkubation über die AUC quantifiziert. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abbildung 32 dargestellt.

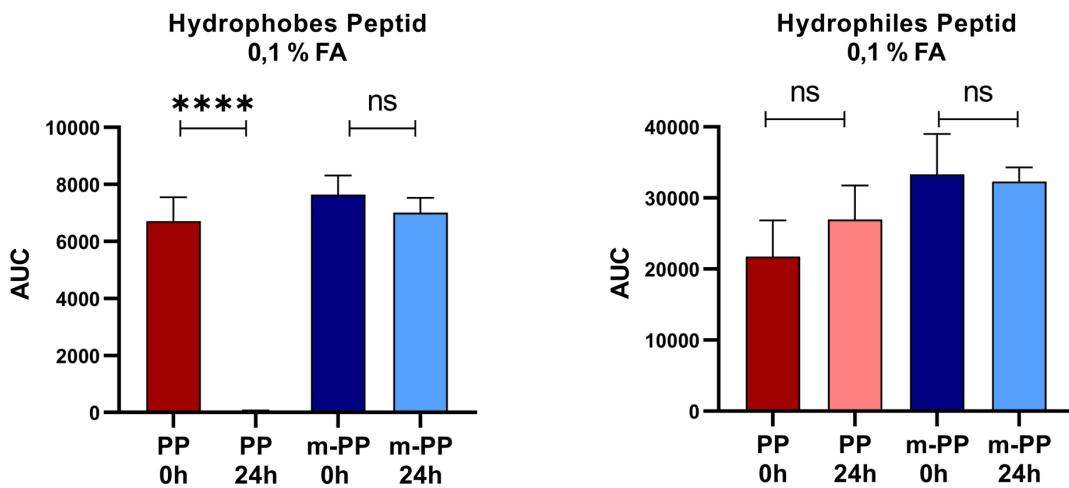


Abbildung 32: Relative Quantifizierung der Peptidabundanzen nach Inkubation in 0,1 % Ameisensäure in Wasser (pH 2,7) in PP- und m-PP-Gefäßen des Herstellers A. Flächen unter der Kurve (Area Under the Curve, AUC) des MRM-Signals für die hydrophoben und hydrophilen Peptide SINPDEAVYYGAAVQAAILSGDK bzw. DGETPDPEDPSRK vor und nach 24 Stunden Inkubation in den jeweiligen Gefäßtypen (PP/m-PP). Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen 0 h und 24 h wurde mittels Welch's t-Test bestimmt: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$, ns = $p > 0,05$. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) der Mittelwerte aus unabhängigen Messungen ($n=6$).

Das hydrophobe Peptid zeigt – wie bereits im APS-Assay nachgewiesen – eine starke Adsorption an das PP-Material. Nach 24 Stunden ist es nahezu vollständig aus der Lösung verschwunden ($p < 0,0001$). Im Gegensatz dazu bleibt das hydrophile Peptid über den gesamten Zeitraum stabil in Lösung und weist keine signifikante Reduktion der Signalintensität auf.

Für das modifizierte PP (m-PP) konnte – unabhängig vom Peptidtyp – keine Adsorption festgestellt werden. Sowohl das hydrophile als auch das hydrophobe Peptid zeigten nach 24 Stunden keine signifikante Veränderung der AUC-Werte, was auf eine deutlich verringerte Oberflächenbindung am modifizierten Material hinweist.

Zur Überprüfung, ob ein ähnliches Adsorptionsverhalten auch bei neutralem pH-Wert auftritt, wurde der Inkubationsversuch in Wasser wiederholt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt.

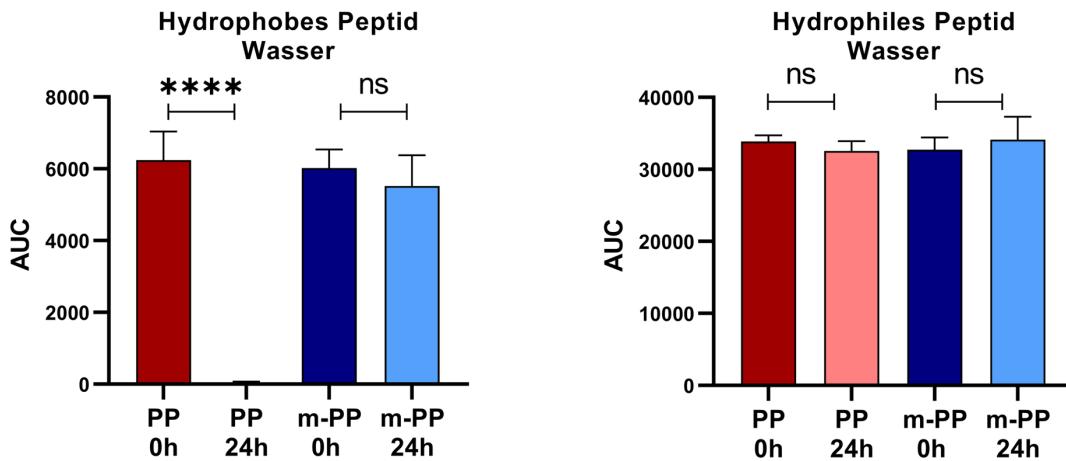


Abbildung 33: Relative Quantifizierung der Peptidabundanzen nach Inkubation in Wasser (pH 7) in PP- und m-PP-Gefäßen des Herstellers A. Flächen unter der Kurve (Area Under the Curve, AUC) des MRM-Signals für die hydrophoben und hydrophilen Peptide SINPDEAVYYGAAVQAAILSGDK bzw. DGETPDPEDPSRK vor und nach 24 Stunden Inkubation in den jeweiligen Gefäßtypen (PP/m-PP). Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen 0 h und 24 h wurde mittels Welch's t-Test bestimmt: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$, ns = $p > 0,05$. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) der Mittelwerte aus unabhängigen Messungen ($n = 6$).

Nach der Inkubation in Wasser (pH 7) zeigen sich vergleichbare Abundanzen wie bei der Inkubation in 0,1 % FA. Das hydrophobe Peptid adsorbiert selektiv an PP-Gefäßoberflächen, während beim hydrophilen Peptid keine Adsorption beobachtet werden konnte. Auch in diesem Fall zeigte das modifizierte PP (m-PP) keinerlei Adsorption.

Zum Abschluss wurde der Einfluss eines organischen Lösungsmittels auf das Adsorptionsverhalten untersucht. Hierzu wurden beide Peptide in einem 50:50-Gemisch (v/v) aus Acetonitril und Wasser gelöst (50 % ACN) und wie zuvor vor und nach der Inkubation die Peptidabundanzen bestimmt (Abbildung 34).

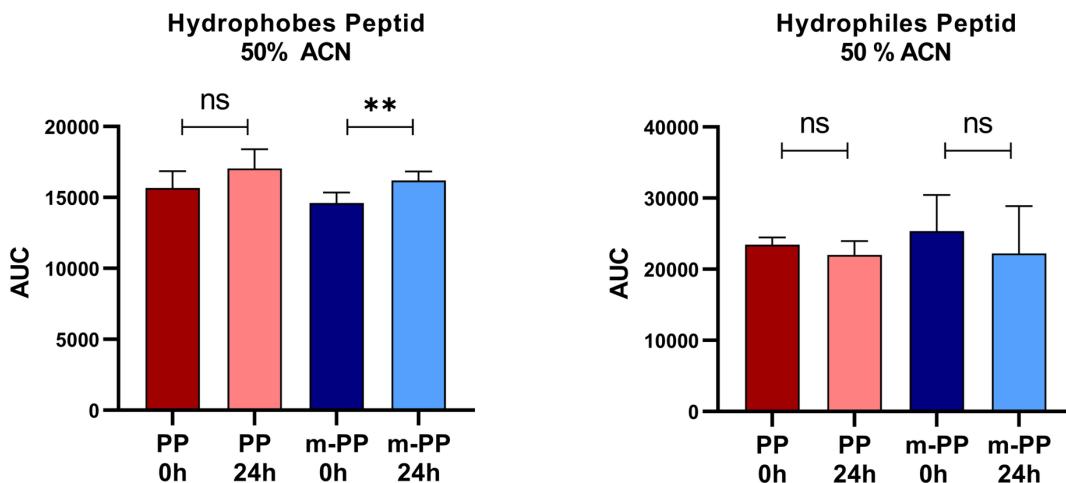


Abbildung 34: Relative Quantifizierung der Peptidabundanzen nach Inkubation in 50% Acetonitril in Wasser in PP- und m-PP-Gefäßen des Herstellers A. Flächen unter der Kurve (Area Under the Curve, AUC) des MRM-

Signals für die hydrophoben und hydrophilen Peptide SINPDEAVYYGAAVQAAILSGDK bzw. DGETPDPEPEDPSRK vor und nach 24 Stunden Inkubation in den jeweiligen Gefäßtypen (PP/m-PP). Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen 0 h und 24 h wurde mittels Welch's t-Test bestimmt: * = $p \leq 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$, ns = $p > 0,05$. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) der Mittelwerte aus unabhängigen Messungen ($n = 6$).

Nach der Inkubation in 50 % ACN in Wasser konnte – anders als in Wasser oder 0,1 % FA – keine Adsorption des hydrophoben Peptids an die Gefäßoberflächen beobachtet werden. Auch beim hydrophilen Peptid zeigte sich keine Veränderung der Abundanz. Im m-PP-Gefäß wurde beim hydrophoben Peptid eine leichte Erhöhung der gemessenen Konzentration festgestellt.

6.4.5. Auswirkung des Labels Fluorescein-Isothiocyanat auf Adsorptionsassays

Wie in Kapitel 3.5.3. beschrieben, werden zur Messung von Adsorption von Peptiden oder Proteinen unter anderem Floreszenz-basierte Assays genutzt, anstelle von Massenspektrometrie-basierter Detektion. Dabei werden die zu untersuchenden Moleküle mit Fluoreszenz-Labels wie zum Beispiel mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markiert, um eine photometrische Messung durchzuführen.

Zur Untersuchung, ob gelabelte Peptide dieselben Adsorptionseigenschaften wie nicht-gelabelte Peptide aufweisen, wurde das hydrophobe Peptid mit einem FITC-Label im *Fast-Assay* getestet. Dazu wurden das gelabelte und das nicht-gelabelte hydrophobe Peptid sofort bzw. nach 24-stündiger Inkubation in 0,1 % FA in Wasser sowie Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung (DPBS-Puffer) bei pH 7,2 gemessen. Da das FITC-Label empfindlich gegenüber niedrigen pH-Werten ist, wurden neben 0,1 % FA in Wasser auch die Adsorption bei Lösung in DPBS-Pufferkonditionen getestet.

Aufgrund der hohen Salzkonzentration im DPBS-Puffer war eine direkte Infusion am Massenspektrometer nicht möglich, weshalb stattdessen eine Messung mit vorheriger Beladung auf eine C18-Reversed-Phase-Säule erfolgte. Die entsalzten FITC-gelabelten hydrophoben Peptide sowie die nicht-gelabelten hydrophoben Peptide wurden zum Vergleich im MRM-Modus gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 35 dargestellt.

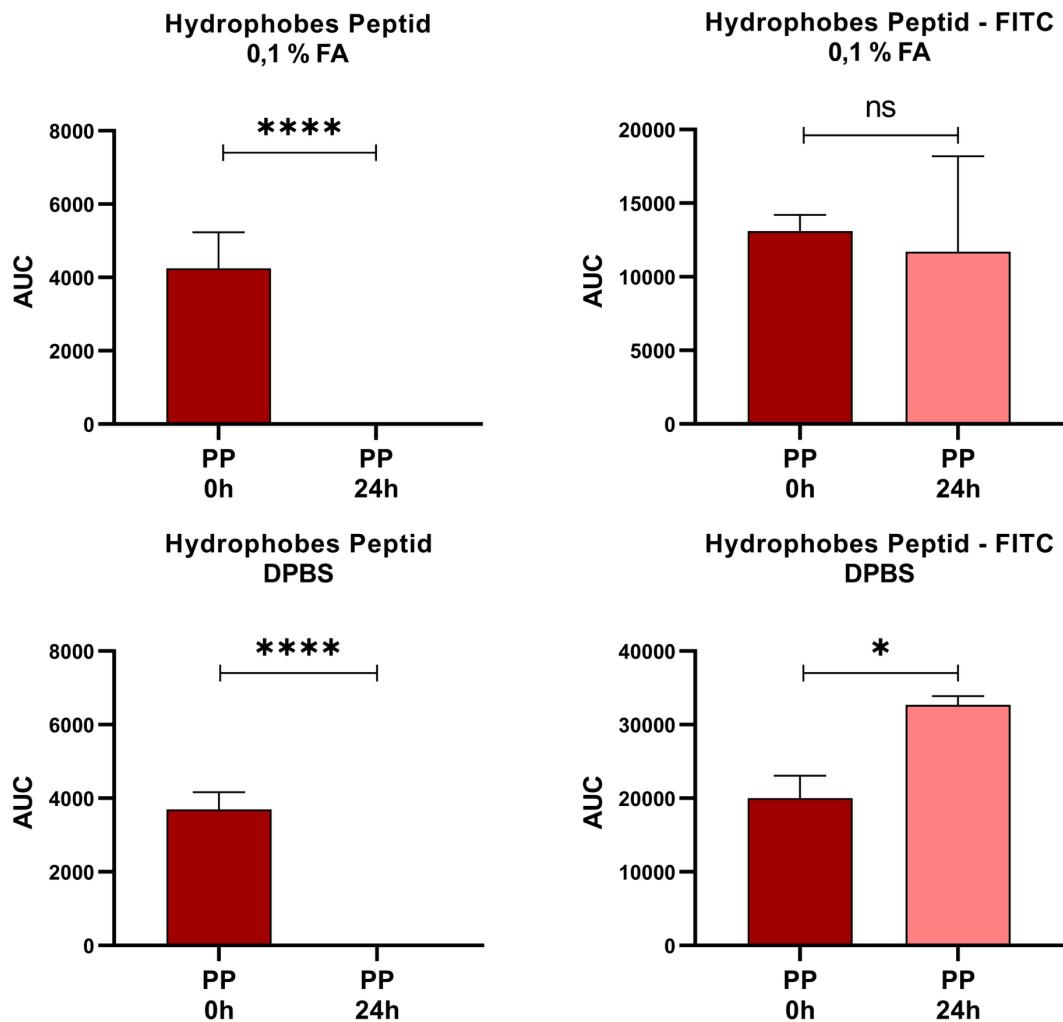


Abbildung 35: Relative Quantifizierung der Peptidabundanzen des hydrophoben Peptides SINPDEAVYYGAAVQAAILSGDK mit und ohne FITC-Label nach Inkubation in 0,1 % Ameisensäure (pH 2,7) und DPBS (pH 7,2) in PP-Gefäßen des Herstellers A. Die Flächen unter der Kurve (Area Under the Curve, AUC) des MRM-Signals zeigen die Peptidabundanz vor und nach 24 Stunden Inkubation. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen 0 h und 24 h wurde mittels Welch's t-Test bestimmt ($n = 3$): * $=p \leq 0,05$, ** $=p < 0,01$, * $=p < 0,001$, **** $=p < 0,0001$, ns $=p > 0,05$. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) der Mittelwerte aus unabhängigen Messungen ($n = 3$).**

Während das nicht-gelabelte Peptid dieselben Adsorptionseigenschaften wie bei der vorherigen Messung über eine direkte Infusion zeigte und auch dieselbe Adsorption bei pH 7,2 in DPBS aufwies, konnte für das gelabelte Peptid keine Adsorption an das PP-Material nachgewiesen werden. Nach Inkubation konnte hingegen sogar eine höhere Abundanz des gelabelten Peptids nach Inkubation festgestellt werden.

6.5. Einfluss der Peptidsekundärstruktur auf das Adsorptionsverhalten

Im bisherigen Verlauf dieser Arbeit wurden hydrophobe Wechselwirkungen als ein wesentlicher Faktor für die Adsorption an PP-Oberflächen identifiziert. Allerdings zeigt sich, dass die alleinige Betrachtung des hydrophoben Charakters der Peptide nicht alle beobachteten Adsorptionsmuster vollständig erklären kann. Daher stellt sich die Frage, welche weiteren Faktoren die Adsorption beeinflussen könnten.

Die zugrunde liegende Hypothese ist, dass Peptide, die definierte Sekundärstrukturen wie α -Helices oder β -Faltblätter ausbilden, amphiphile Konformationen annehmen können. Diese ermöglichen eine einseitige Exposition hydrophober Seitenketten, wodurch die Adsorption an hydrophobe PP-Oberflächen überproportional begünstigt wird.

Im Folgenden werden deshalb neben der Verteilung hydrophober Aminosäuren auch strukturelle Eigenschaften der Peptide, insbesondere potenzielle Sekundärstrukturen, näher untersucht.

6.5.1. Verteilung hydrophober Aminosäuren

Zunächst wurden jene Peptide näher untersucht, die im Rahmen der Entwicklung des APS-Assays als adsorbiert klassifiziert wurden und bei allen drei getesteten PP-Gefäßen eine Adsorption zeigten. In Tabelle 10 sind die zehn am stärksten adsorbierten Peptide aufgeführt.

Tabelle 15: Top 10 der adsorbierten Peptide an PP von Hersteller A, B und C.

PP Hersteller A			PP Hersteller B			PP Hersteller C		
Peptid	Adsorbiert nach 24 h [%]	GRAVY	Peptid	Adsorbiert nach 24 h [%]	GRAVY	Peptid	Adsorbiert nach 24 h [%]	GRAVY
<u>SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK</u>	89,5	0,23	<u>SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK</u>	94,9	0,23	<u>SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK</u>	97,2	0,23
IAPSFAVESIEDALK	87,8	1,16	<u>IITITGTQDQIQNAQYLLQNSVK</u>	91,6	0,57	<u>IITITGTQDQIQNAQYLLQNSVK</u>	97,0	0,57
EILVGDVGQTVDPPYATFVK	87,5	0,18	IYVDDGLISLQVK	88,0	0,43	LFIGGLSFETTDESLR	93,1	0,03
FDQLFDDESDPFEVLK	86,6	0,12	GLAPDLPEDLYHLIK	86,1	0,13	ASGPGLNNTGVPASLPVEFTIDAK	91,7	0,46
EFNEDGALAVLQQFK	83,8	-0,49	LFIGGLSFETTDESLR	85,5	0,03	<u>SLVASLAEPDFVVTDFAK</u>	91,5	0,03
DAAIYLVTSLASK	81,7	0,83	SLDLFNCEVTNLNDYR	84,2	0,29	IYVDDGLISLQVK	90,5	0,43
VLDNYLTSPLEEVDETAEDEGVVSQR	78,5	-0,08	TIAECLADELINAAK	83,9	0,34	LQLETEIEALK	88,5	0,04
<u>IITITGTQDQIQNAQYLLQNSVK</u>	77,3	0,57	<u>SLVASLAEPDFVVTDFAK</u>	82,9	0,03	LAPITSDPTEATAVGAVEASFK	87,6	0,43
NAGNCLSPAVIVGLLK	76,6	0,21	DISEASVFDAYVLPK	81,8	0,10	IDFYFDENPYFENK	87,3	0,05
<u>SLVASLAEPDFVVTDFAK</u>	75,2	0,03	FLDGNELTACNLLPK	79,3	-0,02	DAAIYLVTSLASK	87,2	0,83

Auffällig ist, dass drei Peptide bei allen drei Herstellern zu den Top 10 der am stärksten adsorbierten Sequenzen zählen. Besonders hervorgehoben werden soll das Peptid

SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK, das bei allen drei PP-Herstellern das am stärksten adsorbierte Peptid war und bis zu 97,2 % Verlust bei PP-Gefäßen von Hersteller C aufwies. Interessanterweise handelt es sich hierbei nicht um das Peptid mit dem höchsten GRAVY-Wert – dieser liegt mit 0,23 lediglich im mittleren Bereich. Deutlich höhere GRAVY-Werte zeigen z. B. IITITGTQDQIQNAQYLLQNSVK (GRAVY = 0,57), das zudem mit 23 Aminosäuren exakt die gleiche Länge wie SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK aufweist. Dies verdeutlicht, dass ein höherer GRAVY-Wert allein nicht zwangsläufig zu stärkerer Adsorption führt.

Im Folgenden wurde die Verteilung hydrophober Reste innerhalb dieser Peptidsequenzen anhand des Hydropathie-Indexes von Kyte und Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982) weiter betrachtet. Dieser gibt jeder Aminosäure einen spezifischen Hydropathiewert, aus denen sich auch der GRAVY-Wert eines Peptids zusammensetzt. In Abbildung 36 ist die Verteilung der Hydropathiewerte für die drei am stärksten adsorbierten Peptide visualisiert.

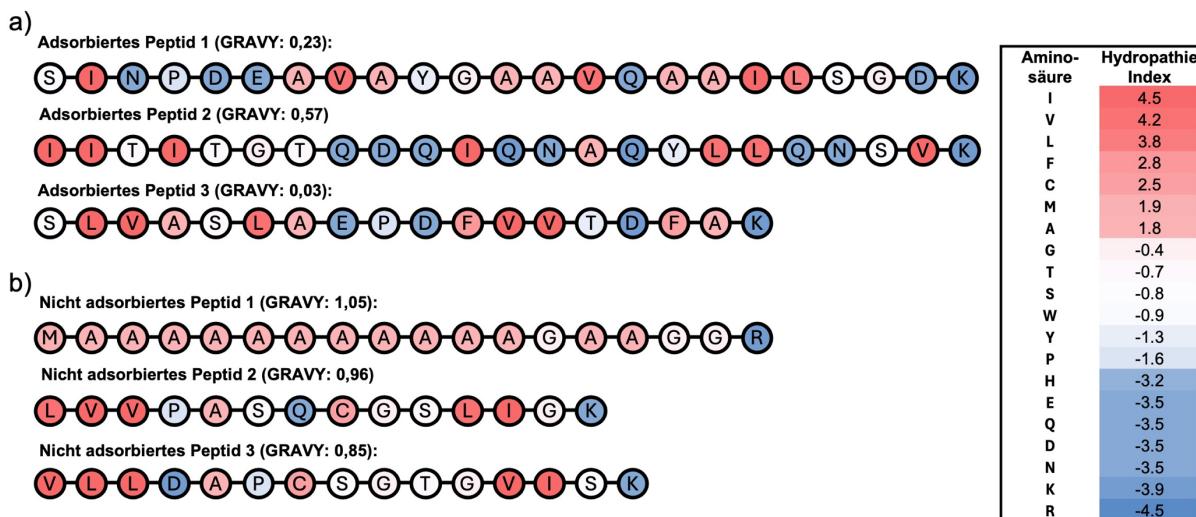


Abbildung 36: Verteilung der Hydropathie-Werte über die adsorbierten Peptide. a) Top 1, 2 und 3 der am stärksten adsorbierten Peptide mit Einfärbung nach Hydropathie-Index. b) Peptide, die einen hohen GRAVY-Wert aufweisen, aber in keinem der Gefäße adsorbiert wurden. Die Farben der Aminosäuren zeigen den Hydropathiewert der einzelnen Aminosäuren nach Kyte und Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982) von hydrophil (-4,5) bis hydrophob (4,5) an.

Bereits durch die rein visuelle Betrachtung lässt sich ein wiederkehrendes Muster erkennen: eine alternierende Anordnung hydrophiler und hydrophober Aminosäuren entlang der Sequenz. Außerdem gibt es einzelne Ausnahmen von der Regel, dass besonders hydrophobe Peptide auch automatisch stark an PP adsorbieren. So sind z.B. die Peptide MAAAAAAAAGAAGGR, LVVPASQCGSLIGK und VLLDAPCSGTGVISK trotz ihres sehr hohen GRAVY-Wertes nicht an die Oberflächen der Gefäße adsorbiert worden. Die beiden

nicht-adsorbierten Peptide 2 und 3 weisen dabei eine hohe Sequenzhomologie und Verteilung hydrophober Aminosäuren auf.

Um zu untersuchen, ob bestimmte strukturelle Eigenschaften die Adsorption beeinflussen, wurden die Chou-Fasman-Propensitäten (Tabelle A5) genutzt, die angeben, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Aminosäure in einer α -Helix, einem β -Faltblatt oder einer Schleife vorkommt (Chou & Fasman, 1974).

Wie aus Tabelle A5 ersichtlich wird, weisen Glycin ($P_\alpha = 0,53$) und Prolin ($P_\alpha = 0,59$) eine sehr geringe Helix-Propensität auf und gelten als klassische Helixbrecher (B_α). Auch im Kontext der β -Faltblatt-Strukturen ist Prolin ($P_\beta = 0,62$) als Brecher eingestuft (B_β).

Obwohl Glycin und Prolin in der Literatur als klassische Brecher sekundärer Strukturelemente gelten, zeigen auch mehrere der stark adsorbierten Peptide in der untersuchten Stichprobe das Vorkommen dieser Aminosäuren. So enthält beispielsweise das stark adsorbierte Peptid SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK sowohl ein Glycin als auch ein Prolin. Die nicht adsorbierten Peptide LVVPASQCGSLIGK und VLLDAPCSGTGVISK enthalten noch ein Glycin mehr, bei gleichzeitig deutlich kürzerer Sequenz. Zusätzlich enthalten beide mittig in der Sequenz ein Cystein, das carbamidomethyliert und somit mit hydrophiler Amidgruppe vorliegt ($-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CONH}_2$).

Da die Analyse rein basierend auf der Aminosäuresequenz zwar erste Schlüsse auf mögliche Sekundärstruktur-bedingte Adsorptionspotentiale zulässt, aber keine direkte Erklärung liefern kann, warum das Peptid SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK nun trotz vergleichsweisen niedrigen GRAVY-Wertes so stark adsorbierte, wurden im Folgenden strukturbasierte Analysen mittels AlphaFold 3 und Zirkulardichroismus-Spektroskopie durchgeführt.

6.5.2. Sekundärstrukturvorhersage mittels AlphaFold 3

Im Folgenden wurde eine Strukturanalyse des Peptids SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK mittels AlphaFold 3 durchgeführt.

Abbildung 37 zeigt das *Heat Shock Cognate 71 kDa Protein* (HSPA8), dessen tryptisches Peptid SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK ist. Die Darstellung basiert auf der AlphaFold-Strukturvorhersage, die mit einem hohen Vertrauenswert ($\text{pLDDT} > 90$) eine zuverlässige Modellqualität bestätigt. Das Peptid in der Sequenz ist rot markiert. Innerhalb des Proteins nimmt die Peptidsequenz eine ausgeprägte α -Helix ein.

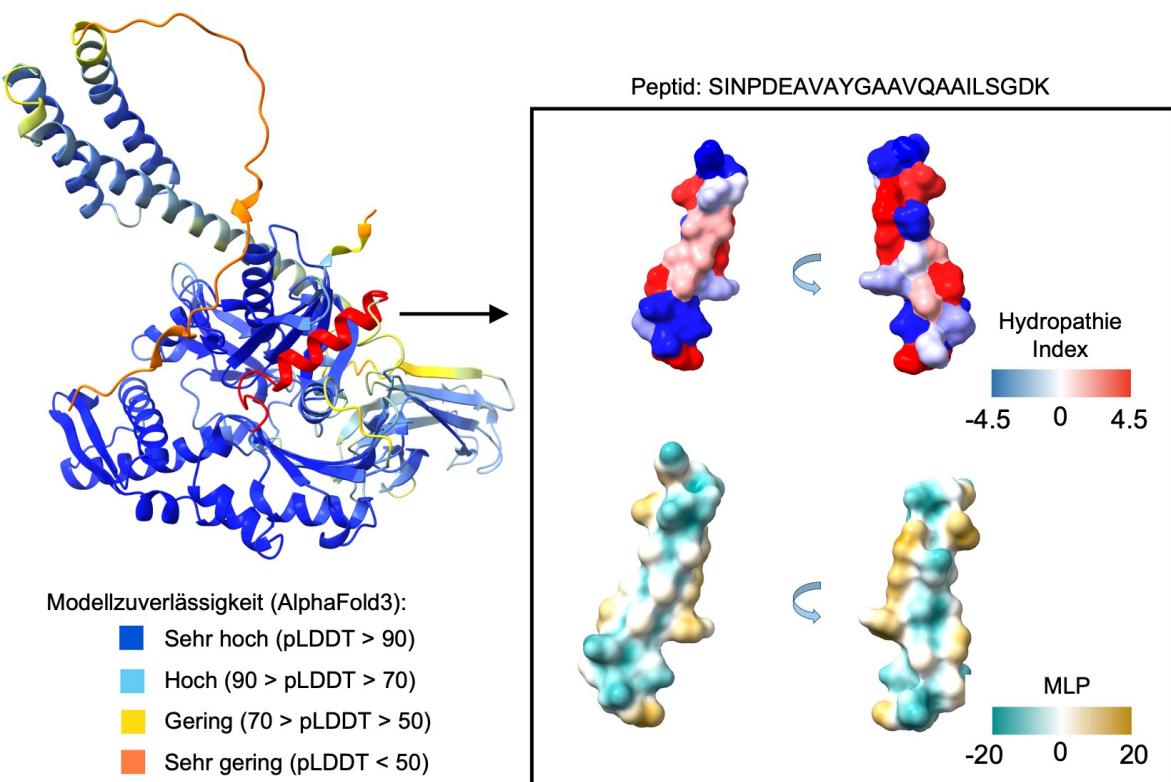


Abbildung 37: AlphaFold 3-basierte Proteinstruktur des Heat Shock Cognate 71 kDa Proteins. Sequenz in rot: SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK, erstellt basierend auf der AlphaFold 3 Structure Database in ChimeraX. Die Hydrophobizität der Aminosäurereste wurden ausgehend vom Hydropathie-Index (Kyte & Doolittle, 1982) oder dem MLP-Wert (Lipophilie) in ChimeraX farblich visualisiert.

Neben der Strukturvorhersage des Peptids innerhalb des Proteins, wurde die Struktur des Peptids auch isoliert modelliert, wo sie ebenfalls eine α -Helix zeigte. Zur Überprüfung der Amphipathie wurde die Hydrophobizität der Aminosäurereste in ChimeraX nach Hydropathie-Index eingefärbt. Die hydrophoben Seitenketten zeigen eine Verteilung, die für eine amphipathische α -Helix typisch ist. Ergänzend wurden die molekularen Lipophiliepotenziale (MLP) der Peptide farblich visualisiert, die ebenfalls auf eine amphipathische Struktur hinweisen.

6.5.3. Sekundärstrukturbestimmung mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Zur experimentellen Validierung der durch AlphaFold 3 vorhergesagten Sekundärstruktur des Peptids SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK wurden Messungen mittels Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie durchgeführt. Im Gegensatz zur computergestützten Strukturvorhersage unter Standardbedingungen erlaubt die CD-Spektroskopie eine experimentelle Bestimmung der Sekundärstruktur in Lösung und unter den tatsächlichen Pufferbedingungen.

Die Messungen wurden in den drei zuvor verwendeten Lösungsmitteln durchgeführt: reinem Wasser, 0,1 % FA und 50 % ACN in Wasser. Zusätzlich wurde das Peptid 15 Minuten lang in 40 % Trifluoroethanol (TFE) in Wasser inkubiert. TFE ist ein häufig verwendetes Struktur-

induzierendes Lösungsmittel, das die Ausbildung von α -Helices begünstigen und helikale Konformationen stabilisieren kann, ohne eine definierte Struktur vollständig zu erzwingen.

Abbildung 38 zeigt die normalisierten CD-Spektren des Peptids in den vier Lösungsmitteln.

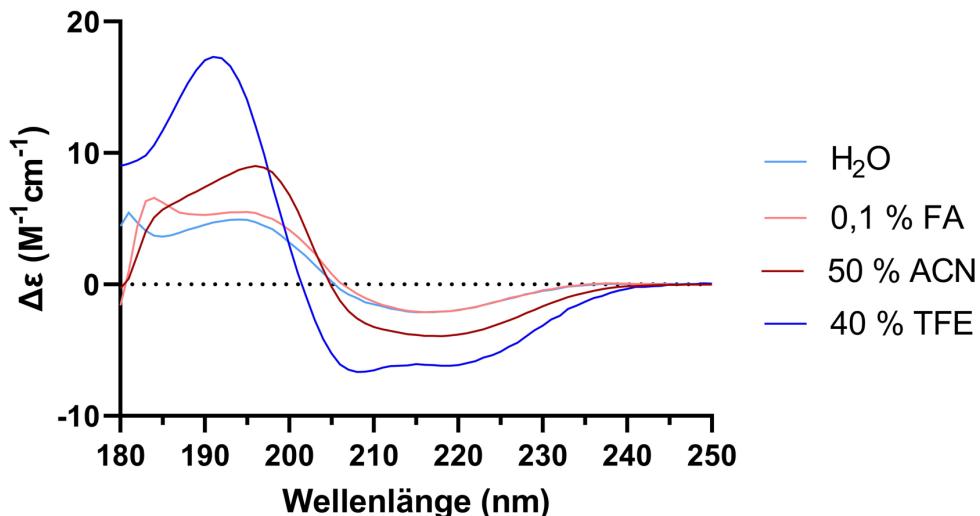


Abbildung 38: CD-Spektren des Peptids SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK in verschiedenen Lösungsmitteln. Lösungsmittel: Wasser (H_2O), 0,1 % Ameisensäure (FA) in Wasser, 50 % Acetonitril in Wasser (ACN) und 40 % Trifluorethanol (TFE) in Wasser. Dargestellt ist der Extinktionskoeffizient ($\Delta\epsilon$) über den Wellenlängenbereich von 180–250 nm. Die mit BestSel berechneten $\Delta\epsilon$ -Werte ($M^{-1}cm^{-1}$) sind unter Berücksichtigung der mittleren Residuum-Masse normalisiert und erlauben daher eine Interpretation auf Ebene der Peptidreste.

Es lassen sich lösungsmittelabhängige Unterschiede in der Sekundärstruktur erkennen. In 40 % TFE zeigt das Peptid ein Spektrum mit deutlich ausgeprägten Minima bei 208 nm und 222 nm sowie einem Maximum bei etwa 190 nm. Dieses Spektrenprofil ist typisch für eine α -helikale Sekundärstruktur und weist auf eine signifikante Ausbildung dieser Struktur in TFE hin.

In ACN lässt sich im Vergleich zu TFE eine Abschwächung der helikalen Signale beobachten. Das Minimum bei 222 nm ist deutlich weniger ausgeprägt, während sich das Spektrum in Richtung eines β -Faltblatt-ähnlichen Profils verschiebt. Besonders auffällig ist dabei das breitere Minimum im Bereich 215–218 nm, was auf die Ausbildung von β -Strukturen hindeutet. Gleichzeitig fehlt ein klares Maximum bei 190 nm, was auf eine geringere helikale Ordnung hindeutet.

Auch in reinem Wasser zeigt das Peptid ein weniger stark strukturiertes Spektrum. Zwar sind noch geringe Anteile helikaler Signaturen vorhanden, jedoch ist das Minimum bei 222 nm kaum ausgeprägt, während sich das Hauptminimum ebenfalls in Richtung ~215 nm verschiebt. Dies spricht für eine bevorzugte Ausbildung von β -Faltblatt-Strukturen oder ungeordneten Bereichen (Random Coil) in wässriger Lösung.

Ein ähnliches Bild zeigt sich in 0,1 % FA. Hier zeigt das Spektrum ebenfalls ein breites Minimum um 215 nm, das auf β -Strukturelemente hinweist. Die Signale für α -helikale Strukturen sind unter diesen Bedingungen nur schwach ausgeprägt, was auf eine geringe Stabilisierung solcher Strukturen in saurem Milieu hindeutet.

Zur quantitativen Auswertung der CD-Spektren wurde das Tool *BestSel* eingesetzt (Kardos et al., 2025), das charakteristische CD-Signaturen Sekundärstrukturen zuordnen kann. Die Analyse wurde für alle vier getesteten Lösungsmittel durchgeführt, um den Einfluss der chemischen Umgebung auf die Struktur des Peptids SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK systematisch zu erfassen. In Abbildung 39 sind sowohl die experimentellen Spektren mit der durch *BestSel* generierten Kurvenanpassung (*Fit*) dargestellt als auch die resultierenden Strukturanteile in Form von Tortendiagrammen visualisiert.

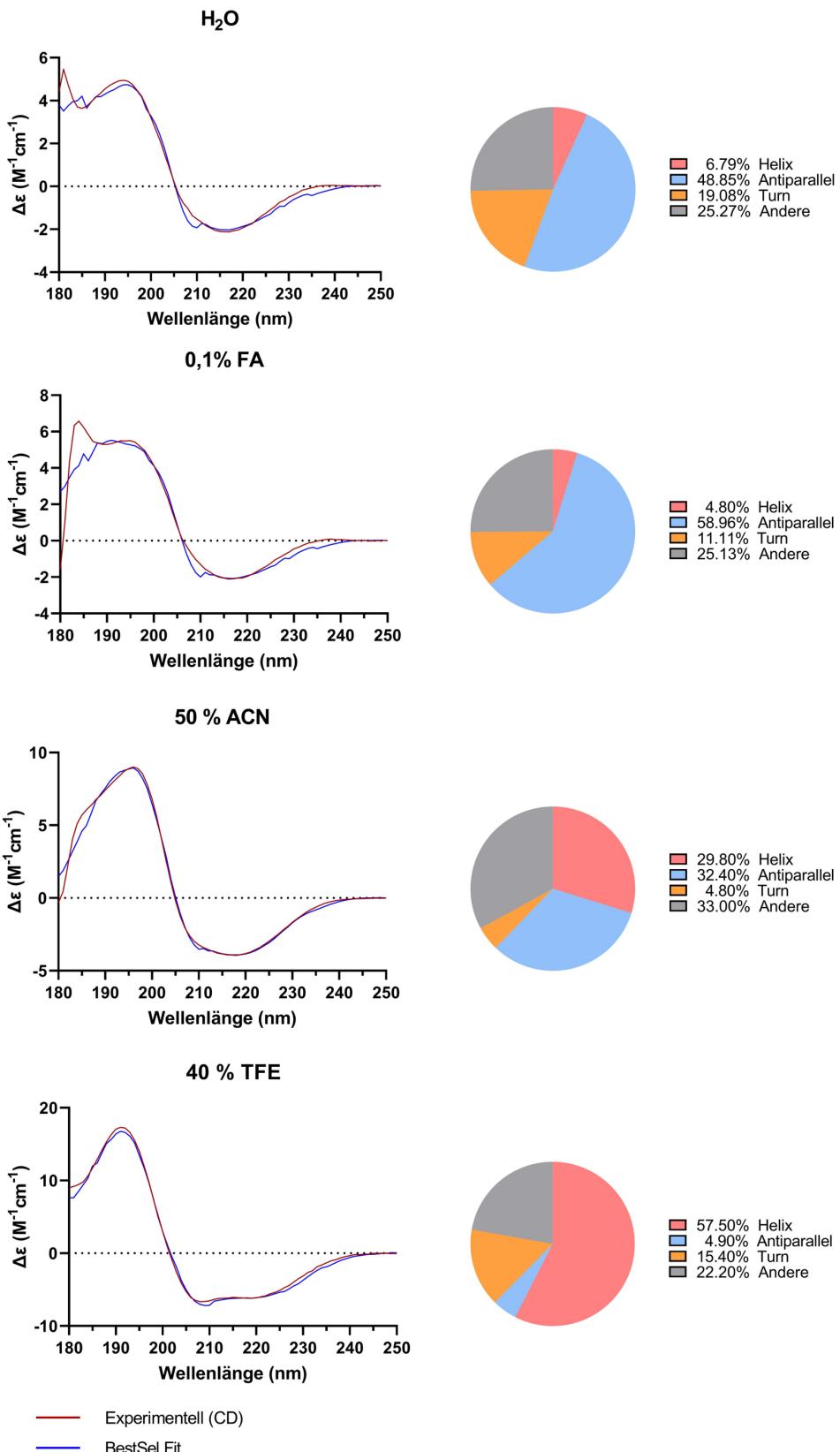


Abbildung 39: Bestimmung der Sekundärstrukturanteile des Peptids SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK in verschiedenen Lösungsmitteln. Dargestellt sind die CD-Spektren ($\Delta\epsilon$ in Abhängigkeit von der Wellenlänge (180-250 nm)) in Wasser (H_2O), 0,1 % Ameisensäure (FA), 50 % Acetonitril (ACN) und 40 % Trifluorethanol (TFE) in Wasser mit den durch BestSel (Micsonai et al., 2021) ermittelten Sekundärstruktur-Fits und den daraus abgeleiteten Strukturanteilen (Helix (α -Helix), Antiparallel (β -Faltblatt), Turn) als Tortendiagramme.

Die Daten zeigen eine deutliche lösungsmittelabhängige Konformation. In Wasser liegt der α -Helix-Anteil bei lediglich 6,79 %, während 48,85 % der Struktur als antiparallele β -Faltblätter klassifiziert wurden. Die Dominanz der β -Faltblatt-Konformationen bleibt auch in 0,1 % FA erhalten, wo der β -Faltblatt-Anteil sogar auf 58,96 % ansteigt, während der helikale Anteil auf 4,8 % absinkt.

Ein deutlicher struktureller Unterschied zeigt sich in 50 % ACN. Hier nimmt der α -Helix-Anteil signifikant zu und erreicht 29,8 %, während antiparallele β -Faltblätter und ungeordnete Anteile etwa gleich verteilt sind.

Die stärkste Ausbildung helikaler Strukturen zeigt sich erwartungsgemäß in 40 % TFE. Hier liegt der Anteil der α -Helix bei 57,5 %, während β -Faltblattstrukturen nur noch mit 4,9 % vertreten sind. Der verbleibende Anteil verteilt sich auf Turns (15,4 %) und ungeordnete Regionen (22,2 %). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Eigenschaft von TFE, intra- und intramolekulare Wasserstoffbrücken zu stabilisieren und somit helikale Konformationen energetisch zu begünstigen (Maroun et al., 2001).

Die Ergebnisse aus der *BestSel*-Analyse wurden zusätzlich mittels weiterer Algorithmen überprüft, dazu gehören *Selcon* (Version 2 bzw. 3) und *Peptide Helicity*, wobei letzterer speziell für zu Alpha-Helices neigenden Peptiden optimiert ist. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 16: Sekundärstrukturvorhersage des Peptids SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Die Analyse erfolgte mit den Algorithmen *BestSel*, *Selcon* (Version 2 bzw. 3) und *Peptide Helicity*. Für jedes Lösungsmittel sind die berechneten Anteile an α -Helix, β -Faltblatt, Turns und sonstigen Strukturen (%) angegeben.

Lösungs- mittel	Eigen- schaften	Algorithmus zur Struktur- vorhersage	Sekundärstruktur (%)			
			α -Helix	β -Faltblatt	Turn	Andere
H_2O	polar	<i>Selcon2</i>	9,5	51,9	8	30,6
		<i>BestSel</i>	6,8	48,9	19,1	25,3
		<i>Peptide Helicity</i>	24	-	-	-
0,1 % FA in H_2O	polar, sauer	<i>Selcon2</i>	8	62,1	6,1	23,5
		<i>BestSel</i>	4,8	59,0	11,1	25,1
		<i>Peptide Helicity</i>	24	-	-	-
50 % ACN in H_2O	polar, aprotisch	<i>Selcon3</i>	39,4	28,2	6,8	25,4
		<i>BestSel</i>	29,8	32,4	4,8	33,0
		<i>Peptide Helicity</i>	43	-	-	-
40 % TFE in H_2O	polar, struktur- induzierend	<i>Selcon2</i>	67,7	-0,2	6,3	26,9
		<i>BestSel</i>	57,5	4,9	15,4	22,2
		<i>Peptide Helicity</i>	65	-	-	-

In Wasser zeigen sowohl *BestSel* als auch *Selcon2* eine klare Dominanz der β -Faltblattstruktur (~49–52 %), mit einem nur geringen Anteil an α -Helix (<10 %), wobei unter sauren Bedingungen (0,1 % FA in Wasser) der β -Anteil weiter ansteigt (~59–62 %), während die Helixanteile gering bleiben. Das *Peptide Helicity* Tool hingegen gibt mit 24 % einen deutlich höheren Helixanteil an.

In Acetonitril zeigt sich ein deutlicher Anstieg des α -Helix-Anteils, mit Werten von 30 % (*BestSel*), 39 % (*Selcon3*) bis zu 43 % (*Peptide Helicity*). Parallel dazu nimmt der β -Anteil ab. Alle drei Methoden zeigen hier eine signifikante Verschiebung hin zu helikaleren Konformationen.

TFE zeigt erwartungsgemäß den höchsten α -Helix-Gehalt, mit bis zu 68 % (*Selcon2*), und minimalem β -Anteil. Alle Algorithmen stimmen in der Haupttendenz überein: TFE fördert eine ausgeprägte helikale Struktur, was mit der bekannten Wirkung des Lösungsmittels übereinstimmt und auf eine alpha-helikale Tendenz des Peptids hindeutet, wie sie bereits von AlphaFold 3 gezeigt wurde.

Zur Untersuchung der thermischen Stabilität der β -Faltblattstrukturen wurde eine temperaturabhängige CD-Spektroskopie-Messung im Bereich von 5 bis 95 °C durchgeführt (Abbildung 40). Die Analyse erfolgte an der Wellenlänge 183 nm, da hier die größten spektralen Änderungen beobachtet wurden und die Modellanpassung besonders stabil war. Die Auswertung der Schmelzkurve mit einem Zwei-Zustands-Modell ergab eine Schmelztemperatur (T_m) von 65,5 °C mit einer geringen relativen Unsicherheit von 0,6 %. Die Enthalpie der Entfaltung wurde mit $\Delta H = 16,17 \text{ kcal mol}^{-1}$ bestimmt. Die zugehörige Schmelzkurve ist in Abbildung A5 dargestellt und belegt die sehr stabile β -Faltblatt Sekundärstruktur in Wasser.

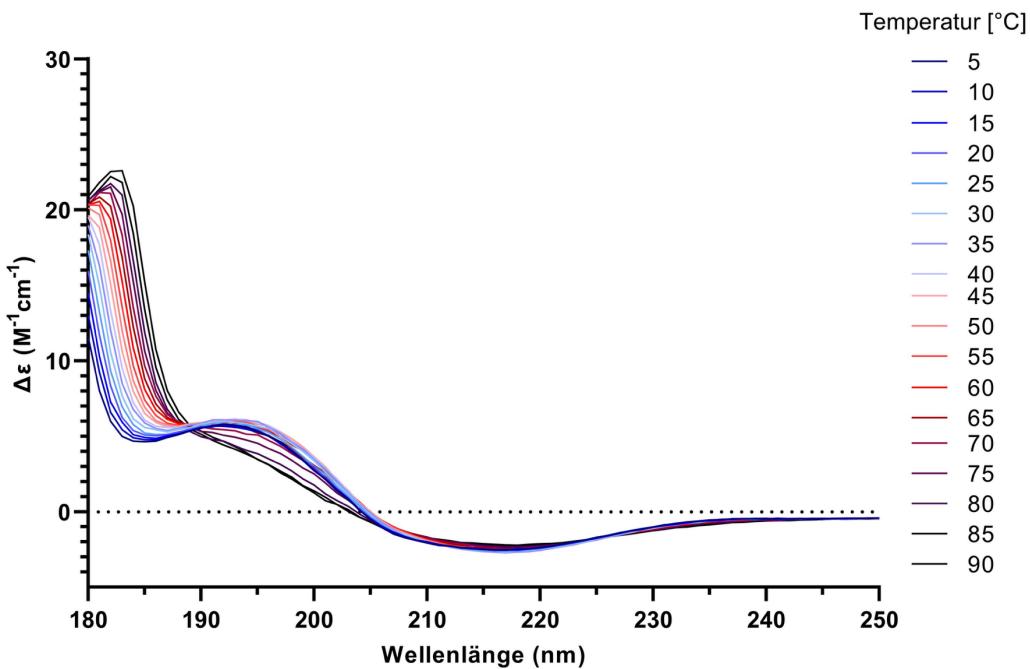


Abbildung 40: Temperaturabhängige CD-Messung des Peptids SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK zur Untersuchung der Stabilität von β -Faltblattstrukturen. Die Messung erfolgte über einen Temperaturbereich von 5–95 °C in 5°-Schritten. $\Delta\epsilon$ in Abhängigkeit von der Wellenlänge (180–250 nm). Normalisiert nach mittlerer Residuum-Masse.

Zusammengefasst bildet das Peptid in allen drei bereits zuvor genutzten Lösungsmitteln Sekundärstrukturen aus, mit größtenteils starker Neigung zur Bildung von beta-Faltblättern und teilweise alpha-Helices und zeigt somit eine Lösungsmittel-abhängige Konformation, die von der mittels AlphaFold 3 vorgesagten Sekundärstruktur abweicht.

6.5.4. Überprüfung einer Peptidaggregation

Durch CD-Spektroskopie wurde eine ausgeprägte β -Faltblattstruktur des Peptids sowohl in reinem Wasser als auch in wässriger Lösung mit 0,1 % FA nachgewiesen. Solche Sekundärstrukturen sind häufig mit aggregationsfördernden Eigenschaften assoziiert und könnten der Grund für die starke Adsorption des Peptids SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK sein.

Um potenzielle aggregationsanfällige Bereiche innerhalb der Sequenz näher zu charakterisieren, wurde AGGRESCAN (Conchillo-Solé et al., 2007) eingesetzt. Dabei identifizierte der Algorithmus zwei ausgeprägte Aggregations-Hotspots, also Sequenzabschnitte mit einer signifikant erhöhten Aggregationsneigung. Ein Hotspot wird dabei definiert als eine Gruppe von mindestens fünf aufeinanderfolgenden Aminosäuren mit Aggregationsneigungswerten (a4v) oberhalb eines festgelegten Schwellenwerts (HST), ohne Beteiligung von Prolin, das als Aggregationsbrecher gilt (Conchillo-Solé et al., 2007). Zur Visualisierung wurde die sogenannten Hot-Spot-Bereiche (HSA) über die Peptidsequenz hinweg geplottet. Diese Kennzahl beschreibt die aggregationsrelevanten Anteile relativ zur

Länge des Peptids. In Abbildung 41 sind die HSA-Profile sowohl des untersuchten Peptids als auch im Vergleich zum Amyloid- β (1–40)-Peptid (Maltseva et al., 2005) dargestellt. Letzteres dient als Referenz für ein Peptid mit hoher Aggregationsneigung.

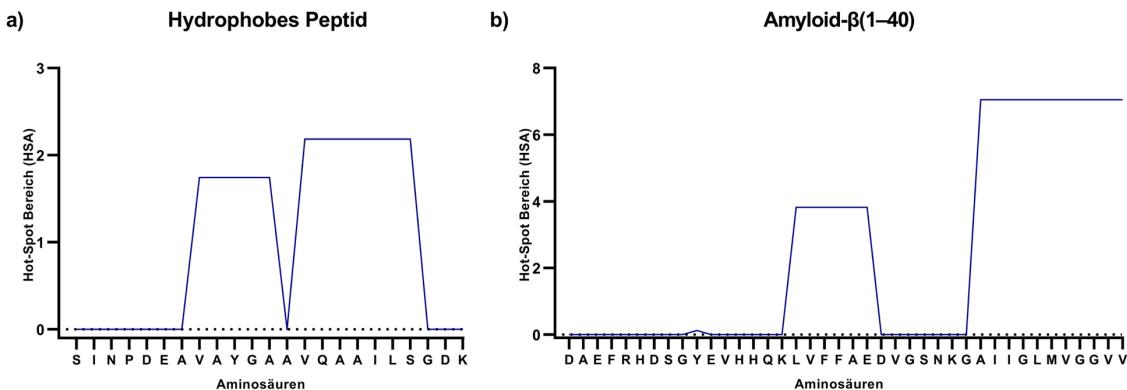


Abbildung 41: Aggregations-Hotspot-Analyse des Peptids SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK. Gezeigt sind die Hotspot-Bereiche (HSA) entlang der Peptidsequenz (a) im Vergleich zum stark aggregierenden Amyloid- β (1–40) als Referenz (b), berechnet mittels AGGRESCAN (Conchillo-Solé et al., 2007).

Der direkte Vergleich beider Profile zeigt, dass auch das untersuchte Peptid ausgeprägte aggregationsgefährdete Regionen besitzt, wenngleich die Gesamtneigung geringer ausfällt als bei A β (1–40). Die identifizierten Hotspots könnten demnach für die beobachtete Strukturstabilisierung und mögliche Aggregation des Peptids SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK und somit dessen starke Adsorption unabhängig vom vergleichsweisen niedrigen GARVY-Score verantwortlich sein.

6.5.5. Anpassung des APS-Assay-Skripts

Da die Sekundärstruktur der Peptide nach unseren Ergebnissen einen Einfluss auf die Adsorption an Oberflächen zeigte, wurde das APS-Assay-Skript erweitert um die Option, eine maximale Peptidlänge einzustellen (variabel einstellbar). Signifikante Zunahme von Peptidsekundärstrukturen werden erst ab einer Peptidlänge > 15 Aminosäuren beobachtet (Field et al., 2019; Zimm & Bragg, 1959) und auch in der Retentionszeitvorhersage von Peptiden in der Umkehrphasenchromatographie treten Vorhersage-Probleme erst zwischen 15 bis 20 Aminosäuren auf, wie zuvor beschrieben (Al Musaimi et al., 2023; Mant et al., 1988). Beispielhaft wurde in Abbildung 42 das APS-Assay-Skript mit einer Peptidlängenbegrenzung von 15 Aminosäuren ausgeführt.

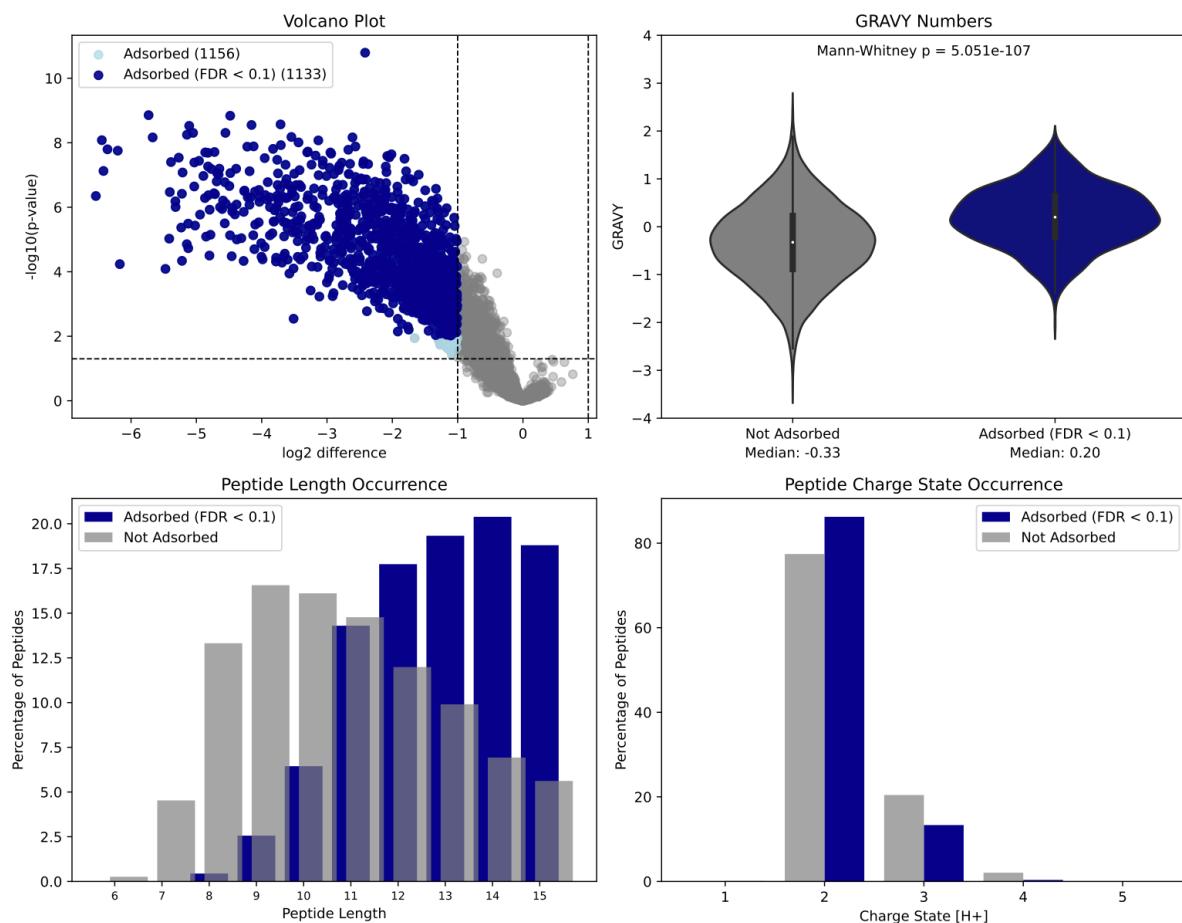


Abbildung 42: APS-Assay von PP von Hersteller A basierend auf Peptiden mit maximaler Peptidlänge von 15 Aminosäuren. Oben links: Volcano-Plot basierend auf den Ergebnissen des Welch's t-Tests. Signifikant adsorbierte Peptide sind hellblau (p -Wert $< 0,05$ und \log_2 -Fold-Change ≤ -1) oder dunkelblau (zusätzlich FDR-signifikant, q -Wert $< 0,1$). Oben rechts: Violin-Plots der GRAVY-Werte von adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden mit Mann-Whitney-U p -Wert. Unten links: Anteil vorhandener Peptidlängen bei adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden in Prozent. Unten rechts: Anteil der jeweiligen Peptidladungen bei adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden in Prozent. Basierend auf 15.639 Peptiden und 5 Replikaten. Erstellt mit dem APS-Assay-Skript.

Bei Anwendung auf bereits zuvor analysierte Datensets der m-PP-Gefäße von Hersteller A führte Filterung des Peptidpools auf Peptide mit einer Maximallänge von 15 Aminosäuren zu einer Reduktion des Datensatzes auf 15.639 Peptide (von 18.938). Nach wie vor lässt sich jedoch für eine große Anzahl von Peptiden (1.133) eine signifikante Adsorption feststellen (vorher 1.793). Bezuglich der Hydrophobizität adsorbiertener Peptide lässt sich eine deutliche Erhöhung des medianen GRAVY-Wertes feststellen von einem Delta von 0,45 beim kompletten Datensatz auf 0,53 nach Reduktion. Gleichzeitig, ist trotzdem noch ein Effekt der Peptidlänge auf die Adsorption zu sehen, da adsorbierte Peptide immer noch deutlich länger sind sowie eine Abnahme von 3-fach positiv geladenen Peptiden im Vergleich zu nicht adsorbierten. Die APS-Assay Ergebnisse sind über Forschungsdatenrepository der Universität Hamburg verfügbar (Tabelle S10, DOI: 10.25592/uhhfdm.18057).

7. Diskussion

In dieser Arbeit wurden zwei Assays entwickelt: der „Adsorption-Properties-of-Surfaces-Assay“ (APS-Assay) und der „Fast-Assay“. Mit diesen lassen sich Adsorptionsprozesse von Molekülen in Abhängigkeit von den Parametern des Lösungsmittels und der Oberfläche systematisch, reproduzierbar und ohne Vorwissen über die chemische Zusammensetzung oder die physikalischen Eigenschaften der Oberfläche untersuchen. Ziel der Entwicklung der Assays war, standardisierte Verfahren bereitzustellen, um Quellen für Probenverluste und Variabilität in der Analytik zu identifizieren und Strategien zur Vermeidung der Adsorption zu entwickeln.

Der APS-Assay nutzt einen komplexen Pool tryptischer Peptide mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften als Sonden, um Wechselwirkungen zwischen Molekülen und Oberflächen quantitativ mittels Flüssigkeitschromatographie-gekoppelter Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) zu analysieren. Dabei werden der Einfluss von Lösungsmittel- und Oberflächenbeschaffenheit auf die Adsorption untersucht.

Zunächst wurden die Rahmenbedingungen und Parameter für die Etablierung der Assays ermittelt. Dabei stellte die Peptidkonzentration von 5 ng/µL die geringstmögliche Konzentration dar, um eine robuste Quantifizierung zu ermöglichen und Verdrängungseffekte (Vroman, 1962) sowie das Risiko der Oberflächensättigung gering zu halten. Die Inkubationszeit von 24 Stunden wurde unter Berücksichtigung eines realistischen experimentellen Anwendungsfalls und der Einstellung eines Äquilibriums gewählt. Reproduzierbarkeitsprüfungen ergaben hohe Pearson-Korrelationen und niedrige Variationskoeffizienten, was die Robustheit und Präzision des APS-Assays nach einer 24-stündigen Inkubation bestätigt.

Bei der Inkubation von Peptiden in Lösungsmitteln sollte das Auftreten variabler Modifikationen berücksichtigt werden. Abhängig vom verwendeten Lösungsmittel sollten diese geprüft und beim Abgleich der aufgenommenen Spektren gegen die *in silico*-Datenbank integriert werden. Erfolgt dies nicht, werden Peptide durch die Änderung ihrer Masse, bedingt durch die Modifikation, nach der Inkubation nicht mehr durch die Suchalgorithmen bei der Datenbanksuche detektiert. In der Folge reduziert sich ihre Abundanz, wie auch die der adsorbierten Peptide. Im Fall der Inkubation in 0,1 % Ameisensäure (FA) in Wasser wurden die Oxidierung, die Bildung von Pyroglutamat (Svozil & Baerenfaller, 2017) und Formylierungen (Zheng & Doucette, 2016) berücksichtigt. Die Analyse der Peptidabundanzen zeigte, dass einige Peptide nach Inkubation in höherer Abundanz vorlagen. Die Hälfte dieser Peptide war während der Inkubation oxidiert, während weitere Pyroglutamat-modifiziert (22 %) oder formyliert (1 %) waren. Das Auftreten variabler Modifikationen sollte daher bei der Durchführung des APS-Assays stets berücksichtigt werden, um Fehlinterpretationen zu

vermeiden. Einige Peptide zeigten nach der Inkubation eine leicht erhöhte Abundanz, obwohl sie keine Modifikationen aufwiesen. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um technische Effekte, die durch eine verbesserte Ionisierung nach der Adsorption koeluierernder Peptide mit hoher Ionisations- und Desorptionswahrscheinlichkeit verursacht werden. Dies ist ein typisches Beispiel für reduzierte Ionenunterdrückung (Annesley, 2003). Diese Peptide waren jedoch von untergeordneter Bedeutung für den APS-Assay und hatten keinen weiteren Einfluss auf die Ergebnisse.

Im Rahmen des APS-Assays wurde bewusst auf eine Datennormalisierung verzichtet. Die standardmäßig verwendeten Normalisierungsverfahren im Bereich der Bottom-up-Proteomik zum Ausgleich von Injektionsschwankungen bzw. Schwankungen aus dem proteolytischen Verdau (Callister et al., 2006) wurden somit nicht durchgeführt, da diese zu Datenverzerrungen führten. Die Schwankungen des Injektionsvolumens des Autosamplers liegen bei der verwendeten HPLC unter 0,25 % relativer Standardabweichung (RSD) bei 5 µL Volumen, was einer maximalen Schwankung von 0,0125 µL entspricht und somit vernachlässigbar ist (Thermo Fisher Scientific, 2013). Durch die Verwendung des Referenzgemisches sind keine Schwankungen durch die Probenvorbereitung zu erwarten.

Am Beispiel von Gefäßen und Lösungsmitteln, die in der Bottom-up-Proteomik verwendet werden, zeigten die APS-Assay-Ergebnisse signifikante Unterschiede im Adsorptionsverhalten zwischen den Gefäßen verschiedener Hersteller. Insbesondere die 1,5-mL-Gefäße aus Polypropylen (PP) aller Hersteller (A, B, C) zeigten eine deutliche Adsorption von Peptiden in Kombination mit 0,1 % FA in Wasser. Bei Hersteller C waren insgesamt 412 Peptide so stark an das PP adsorbiert, dass sie nach der Inkubation in keinem Replikat mehr quantifiziert werden konnten. Ihre Abundanz lag unterhalb der Signalgrenze für eine MS2-Selektion bzw. unter der Identifikationsschwelle in der Datenbanksuche. Die Überlappungsanalyse zeigte, dass viele der adsorbierten Peptide zwischen den Gefäßen der drei Hersteller identisch waren, was auf eine ähnliche Oberflächenchemie hindeutet. Unterschiede im Adsorptionsmuster sind dennoch erwartbar, da zusätzlich zur chemischen Zusammensetzung auch die Topografie bzw. Oberflächenrauheit der Gefäße das Adsorptionsverhalten beeinflusst (Carraher, 2000).

Die Analyse auf Basis der Aminosäuresequenz ergab, dass an PP-Gefäße adsorbierte Peptide nach Inkubation in 0,1 % FA in Wasser mit einem pH-Wert von 2,7, tendenziell länger und hydrophober (höherer GRAVY-Wert) sind als nicht-adsorbierte und einen großen Anteil an hydrophoben Aminosäuren wie Isoleucin, Leucin, Alanin und Phenylalanin enthalten, die bevorzugt hydrophobe Wechselwirkungen mit Oberflächen eingehen können. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass PP-Gefäße eine hydrophobe Oberfläche aufweisen (Vámos et al., 2024), wie sie für unpolares, unbehandeltes Polypropylen mit der Wiederholungseinheit

$(C_3H_6)_n$ charakteristisch ist. Unbehandeltes PP zeigt einen Wasser-Kontaktwinkel von etwa $96 \pm 1^\circ$ (Brown & Bhushan, 2016). Dieser Wert liegt über der 90° -Marke, weshalb das Material als hydrophob gilt (Jhaveri & Murthy, 2016). Längere Peptide weisen mehr potenzielle Kontaktstellen auf, wodurch sie häufiger multipunktbasierte Wechselwirkungen mit der Oberfläche eingehen können, was die Adsorptionsstabilität erhöht.

Im Gegensatz zu den PP-Oberflächen konnte bei den modifizierten PP-Oberflächen (m-PP) von Hersteller A und C keine signifikante Adsorption festgestellt werden. Bei den m-PP-Gefäßen von Hersteller B hingegen wurde eine Adsorption detektiert. Die adsorbierten Peptide bei diesem Gefäß zeigten zudem große Überlappungen mit Peptiden, die an PP verschiedener Hersteller gebunden hatten und auf eine weiterhin ähnliche Oberflächenbeschaffenheit wie die der PP-Gefäße hinweist.

Interessanterweise wurde ein Peptid in den m-PP-Gefäßen des Herstellers A ausschließlich in der 0-h-Kontrolle detektiert und war nach der Inkubation nicht mehr nachweisbar, ein Ergebnis, das nicht mit den Ergebnissen der quantitativen Analyse übereinstimmt. Diese Beobachtung verdeutlicht eine grundlegende Herausforderung der Bottom-up-Proteomik: Das Fehlen eines Peptidsignals bedeutet nicht zwangsläufig das tatsächliche Fehlen des Peptids, sondern kann unterschiedliche Ursachen haben. Im *Data-Dependent Acquisition* (DDA)-Modus sind fehlende Werte eine bekannte Limitation und lassen sich typischerweise in zwei Kategorien einteilen: *Missing at Random* (MAR) und *Not Missing at Random* (NMAR) (Lazar et al., 2016; Liu & Dongre, 2021). MAR-Werte entstehen dadurch, dass im DDA-Modus nur die jeweils intensivsten Vorläuferionen (Top-N) für die Fragmentierung ausgewählt werden. Weniger abundant vorhandene Peptide bleiben dabei möglicherweise unfragmentiert und somit unidentifiziert, obwohl sie prinzipiell vorhanden sind. NMAR-Werte hingegen betreffen Peptide, deren Signal tatsächlich unterhalb der Detektionsgrenze liegt und die daher methodenbedingt nicht erfasst werden können. Die Imputation von fehlenden Werten in Proteomdatensätzen, insbesondere wenn unterschiedliche Fehlwerttypen vorliegen, wird in der aktuellen Literatur kritisch diskutiert (Harris et al., 2023; Mou et al., 2025). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie bewusst auf eine Imputation verzichtet und der Datensatz reduziert.

Für Autosampler-geeignete Gefäße aus Glas (G) konnte eine noch deutlich stärkere Adsorption für anteilig mehr als 18 % aller quantifizierten Peptide festgestellt werden. Gleichzeitig lag der Anteil der Peptide, die in den 24 Stunden inkubierten Proben gar nicht mehr identifiziert wurden bei 104 Peptiden und damit nicht signifikant höher als bei den PP-Gefäßen. Die Adsorption betraf also mehr Peptide, war aber weniger stark ausgeprägt für spezielle Peptide.

Die Gründe für die starke Adsorption an Glas, im Fall der G-Gefäße aus Borosilikatglas, liegen in den physikochemischen Charakteristika der Oberfläche in Kombination mit den Eigenschaften des verwendeten Lösungsmittels. Laut Hersteller besteht das Borosilikatglas hauptsächlich aus Silizium und Sauerstoff und kann Spuren von Bor und Natrium enthalten (Produktbeschreibung Hersteller D). Auf der Oberfläche befinden sich bei Kontakt mit Wassermolekülen Silanolgruppen ($\equiv\text{Si}-\text{OH}$) (Zhuravlev, 2000). Neben den hydrophilen Silanolen ($\equiv\text{Si}-\text{OH}$) können nach thermischer Behandlung auch wieder hydrophobe Siloxane ($\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$) entstehen (Zhuravlev, 1987; Y. Yu et al., 2018; Schrader et al., 2018). Abhängig vom pH-Wert des wässrigen Lösungsmittels findet eine Dissoziation der Silanolgruppen statt ($\equiv\text{Si}-\text{OH} \rightleftharpoons \equiv\text{Si}-\text{O}^- + \text{H}^+$) (Onizhuk et al., 2018). Somit kann pH-Wert-abhängig die Oberfläche von Glas unterschiedlich geladen vorliegen. Dieser Punkt ist abhängig vom Zeta-Potenzial des Glases bei Kontakt mit wässrigen Lösungen. Ein Zeta-Potenzial von 0 (Ladungsnulppunkt) wurde in mehreren Publikationen beschrieben und untersucht. Dabei wurden Werte von pH 2 bis pH 4 genannt, die von der Oberflächenbeschaffenheit des Glases abhängen (Gu & Li, 2000; Patwardhan et al., 2012; Amadu & Miadonye, 2017). Da 0,1 % Ameisensäure einen pH-Wert von 2,7 hat und somit über dem Ladungsnulppunkt liegt, kann das Glas anteilig noch $\text{Si}-\text{O}^-$ auf seiner Oberfläche enthalten. Mittels des APS-Assays wurde eine verstärkte Adsorption von 3-fach positiv geladenen Peptiden beobachtet, die neben dem protonierten N-Terminus und einer basischen Aminosäure am C-Terminus (Arginin/Lysin) zusätzlich Histidin enthielten. Die stärker positiv geladenen Peptide gehen elektrostatische Wechselwirkungen mit dem geladenen Glas ein und werden adsorbiert. Passenderweise lagen die sauren Aminosäuren zu geringeren Anteilen in adsorbierten Peptiden vor und können trotz pKs-Werten von 3,9 (Aspartat) und 4,3 (Glutamat) (Bjellqvist et al., 1993) bei pH 2,7 noch zu geringen Anteilen negativ geladen sein und werden von den negativen $\text{Si}-\text{O}^-$ abgestoßen. Neben den elektrostatischen Wechselwirkungen kann es beim Glas zusätzlich zu Wasserstoffbrücken und anderen Wechselwirkungen, beispielweise durch Van-der-Waals-Kräfte kommen (Roth et al., 1996; Patwardhan et al., 2012), die die Adsorption weiter verstärken.

Mit dem APS-Assay wurde auch die Adsorption hydrophober Peptide, mit höheren GRAVY-Werten als bei nicht adsorbierten Peptiden, an Glas nachgewiesen. Dieser Effekt wurde bereits zuvor von Puddu und Perry beschrieben (Puddu & Perry, 2012), wo ebenfalls ein hydrophobes Peptid mit der Sequenz (AFILPTG) an die Glasoberfläche adsorbierte. Die hydrophoben Wechselwirkungen können jedoch nicht auf Wechselwirkungen mit Siloxangruppen zurückgeführt werden, da diese nach Wasserbenetzung nicht auf der Oberfläche des Borosilikatglases vorhanden sind (Schrader et al., 2018; Zhuravlev, 2000). Die Autoren wiesen auch eine signifikant stärkere Adsorption des Peptids bei höheren Konzentrationen nach und schlugen eine Formation von multiplen Schichten basierend auf Van-der-Waals-Kräften vor. Da aber besonders hydrophobe Peptide adsorbierten, können

auch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Peptiden vermutet werden, so wie es auch schon Motta et al. bei den Formationen von Polypeptid-Multischichten beschrieben haben (Motta et al., 2024). Eine zusätzliche Erklärung bietet die Ausbildung von β -Faltblatt-Strukturen und Aggregaten, die hydrophobe Peptid-Peptid-Wechselwirkungen verstärken können (Bellesia & Shea, 2009).

Beim Hersteller der modifizierten Glasgefäße (m-G) wird gezielt eine Verringerung freier Ionen auf der Oberfläche beworben („Low Retention“). Mithilfe des APS-Assays konnte eine leichte Reduktion der Adsorption an die Glasoberfläche nachgewiesen werden, mit immer noch 655 signifikant adsorbierten Peptiden. Gleichzeitig zeigte sich jedoch, dass die adsorbierten Peptide weitgehend mit denen übereinstimmten, die auch an den unmodifizierten Glasgefäßen (G) adsorbiert wurden, und somit die gleichen Wechselwirkungen zeigten. Der APS-Assay bietet also die Möglichkeit, eine Testung der Oberfläche unabhängig von den Herstellerangaben durchzuführen, um die Nutzbarkeit des Gefäßes für die geplante Analyse zu bewerten. Die Nutzung von Glasgefäßen sollte auf Basis der APS-Assay-Ergebnisse vermieden werden, besonders in Kombination mit 0,1 % FA in Wasser.

Als Alternative zu den Glasgefäßen wurden Autosampler-kompatible, modifizierte 96-Well-Mikrotiterplatten (m-PP-Platten) getestet, die eine deutlich verringerte Adsorption aufwiesen und sich somit signifikant besser zur vorübergehenden Probenlagerung bis zur Injektion eignen. Bei den unmodifizierten PP-Platten konnten nach der Inkubation Peptide mit höherer Abundanz und sehr hydrophilen Eigenschaften detektiert werden. Wie eingangs beschrieben, könnte dies auf eine verbesserte Ionisation hydrophiler Peptide zurückzuführen sein, die durch die Adsorption hydrophober Peptide begünstigt wird. Dies wurde bei den zuvor untersuchten 1,5-mL-PP-Gefäßen nicht beobachtet und deutet auf eine andere chemische Zusammensetzung des Materials hin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dem APS-Assay gezeigt werden konnte, dass die Verwendung von Gefäßen aus Polypropylen (PP) zu einem erheblichen Verlust von Analyten durch Adsorption aufgrund hydrophober Wechselwirkungen führen kann. Auch Glasgefäße sollten vermieden werden, obwohl sie derzeit noch häufig als Standardgefäß in der Proteomanalytik verwendet werden. Sie führen in Kombination mit 0,1 % FA in Wasser zu signifikanter Adsorption. Problematisch ist dabei, dass das verwendete Gefäßmaterial für den Autosampler in vielen Studien nicht im Material- und Methodenteil angegeben wird, obwohl es einen entscheidenden Einfluss auf die Messergebnisse haben kann. Für modifiziertes Polypropylen (m-PP) konnte bei zwei getesteten Gefäßen keine Adsorption festgestellt werden. Diese Gefäße sind daher unter den in dieser Studie verwendeten Bedingungen (0,1 % FA in Wasser) gut für die Analyse geeignet. Es ist davon auszugehen, dass die PP-Oberflächen chemisch behandelt oder physikalisch verändert wurden, um eine hydrophilere

Oberfläche zu erzielen (Uehara et al., 2016; Weikart et al., 2017; Zhou et al., 2024). Genaue Angaben werden von den Herstellern nicht gemacht und sind patenrechtlich geschützt. Der APS-Assay ermöglicht dennoch eine zuverlässige Beurteilung der Eignung von Probengefäßen. Da die m-PP-Platten des Herstellers A keine Adsorption zeigten, konnte der Ablauf des APS-Assays weiter optimiert werden. Die Injektion erfolgte nun nicht mehr aus Glasgefäßen, sondern aus der m-PP-Platte. Zudem wurde die Messung der PP-Gefäße des Herstellers A, mit Injektion aus den m-PP-Platten, auf einem leistungsfähigeren LC-MS/MS-System wiederholt. Die Ergebnisse waren identisch, basierten jedoch auf einem größeren Pool quantifizierter Peptide.

Anschließend wurde untersucht, ob die Adsorption von Peptiden an Polypropylen-(PP)-Oberflächen einen direkten Einfluss auf die Quantifizierung von Proteinabundanzen in Bottom-up-Proteomik-Studien haben kann. Dazu wurden die Abundanzen der Peptide summiert, die eindeutig einem Protein zugeordnet werden konnten (*unique peptides*), vorausgesetzt, dass mindestens zwei solcher Peptide pro Protein vorlagen.

Bereits nach der 24-stündigen Lagerung der Proben traten signifikante Unterschiede in den Proteinabundanzen auf, die ausschließlich auf den Verlust adsorbiertener Peptide zurückzuführen waren. Trotz Anwendung von Normalisierung (hier: Median-Normalisierung) konnten diese Effekte nicht kompensiert werden, da nicht alle Peptide gleichermaßen von der Adsorption betroffen waren. Bei vielen Proteinen führte die Adsorption einzelner Peptide zu einer signifikanten Abnahme der Proteinabundanz, wobei bereits ein einzelnes Peptid ausreichend war, um diesen Effekt zu verursachen. Die Identifikation betroffener Proteine wie TRMT112, ARF1, SLC38A2 oder C1QB zeigte exemplarisch, wie empfindlich Bottom-up-Analysen auf die Adsorption reagieren können. All diese Proteine wiesen nach der Inkubation stark verringerte Abundanzen auf, wodurch sie fälschlicherweise als potenzielle Biomarker erscheinen könnten. Dies kann zu Fehlinterpretationen von Daten, fehlerhaften Annahmen oder Problemen bei der Validierung von Hypothesen führen.

Die Durchführung der Gene-Set-Enrichment-Analyse (GSEA) verdeutlichte, dass falsche Proteinabundanzen nicht nur einen Einfluss auf Einzelproteine haben, sondern ganze biologische Interpretationen verändern können. Die Anreicherung des KEGG-Gensets *Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection*, einem humanen Krebs-auslösendem Virus (Mesri et al., 2010), beruht auf vier Proteinen. Die verantwortlichen Peptide von GNB1 und GNB2, sind sehr hydrophob und wiesen zusätzlich eine hohe Sequenzhomologie auf. Dasselbe galt für die Proteine SLC25A5 und SLC25A6. Die Anreicherung neurodegenerativer Signalwege von Prion-, Alzheimer- oder Parkinson-Erkrankungen in der GSAE zeigt, wie irreführend die adsorptionsbedingten Veränderungen sein können.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Adsorption von Peptiden an Kunststoffoberflächen gravierende Auswirkungen auf die Daten einer Bottom-up-Proteomanalyse haben können. Sie reichen von veränderten Proteinabundanzen über fehlerhafte statistische Signifikanzen bis hin zu biologisch falschen Schlussfolgerungen. Diese Befunde unterstreichen die Notwendigkeit, bereits bei der Probenvorbereitung und Lagerung auf potenzielle Fehlerquellen wie Adsorption zu achten, insbesondere in quantitativen Studien. Darüber hinaus sollte stets eine Randomisierung der Proben erfolgen, um zumindest teilweise die statistische Signifikanz adsorptionsbedingter Abundanzveränderungen abzumildern. Dies betrifft neben den hier getesteten Peptiden auch andere Molekülklassen, die in Probengefäßen gelagert werden, wie zum Beispiel Proteine.

Zur weiteren Optimierung des APS-Assays wurde ein automatisiertes Python-Skript entwickelt. Für die Auswertung wird lediglich die Tabelle mit den Peptidabundanzen aus der Proteomics-Datenbanksuche benötigt. Das Skript reduziert den Analyseaufwand von mehreren Stunden auf wenige Minuten und ermöglicht eine präzise Analyse der Adsorptionsprozesse. Zusätzlich bietet es die Möglichkeit, anhand des Lösungsmittel-pH-Wertes die Peptidladungen zu berechnen, was die Bewertung der Interaktionen zwischen Peptiden und Oberflächen in verschiedenen Lösungsmitteln verbessert. Gleichzeitig minimiert das Skript Fehler, die bei manueller Durchführung auftreten könnten, und unterstützt die Anwendung strenger statistischer Cut-Offs.

Mit der Entwicklung des Tandem-Quadrupol-basierten „Fast-Assays“ wurde erfolgreich ein zeiteffizientes Verfahren etabliert, das die Untersuchung der Adsorption an Oberflächen deutlich beschleunigt. Im Vergleich zum ursprünglichen APS-Assay, der auf chromatographischer Trennung und Messung eines großen Analytenpools mittels LC-MS/MS basiert und entsprechend zeitintensiv ist, ermöglicht der *Multiple Reaction Monitoring* (MRM)-basierte Ansatz eine Analyse innerhalb von nur 2,5 Minuten pro Messung. Diese erhebliche Zeitsparnis (bis zu 95 %) eröffnet neue Anwendungsmöglichkeiten – insbesondere für systematische Kinetikstudien oder Screening-Experimente unter variierenden Bedingungen bzw. mit einer Vielzahl zu testenden Oberflächen.

Für den Assay wurden zwei Peptide mit konträren Adsorptionsverhalten ausgewählt: das stark adsorbierende, hydrophobe Peptid SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK, das bei allen drei getesteten PP-Gefäßen die stärkste Adsorption zeigte (GRAVY-Wert: 0,23), sowie das hydrophile Peptid DGETPDPEDPSRK (GRAVY-Wert: -2,51), das als Kontrollpeptid diente und im APS-Assay nicht an PP oder Glas adsorbierte. Die Kinetikexperimente zeigten, dass das hydrophobe Peptid in Polypropylengefäß und Lösung in 0,1 % FA in Wasser bereits innerhalb der ersten 1,5 Stunden etwa 50 % seiner Ausgangskonzentration verlor. Dies weist auf eine schnelle und effektive Bindung an die unpolare PP-Oberfläche hin. In Glasgefäßen

verlief die Adsorption desselben Peptids deutlich langsamer und weitgehend linear, was die Affinität des Peptids zu hydrophoben Oberflächen unterstreicht. Gleichzeitig deutet das Verhalten in Glasgefäßen darauf hin, dass bei einem pH-Wert von 2,7 Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte zur Adsorption beitragen, diese jedoch zu einer wesentlich langsameren Adsorption als die hydrophoben Wechselwirkungen mit PP führten. Das hydrophile Kontrollpeptid blieb in PP-Gefäßen über die gesamte Inkubationsdauer stabil in Lösung, was seine Eignung als Negativkontrolle bestätigt. In Glasgefäßen wurde hingegen eine minimale, aber messbare Adsorption beobachtet. Die Ergebnisse der Kinetikstudien stimmen mit den Resultaten aus dem APS-Assay überein und validieren die Eignung des entwickelten Fast-Assays für weiterführende Testreihen.

Nach Zugabe von n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) konnte keine Adsorption mehr beobachtet werden. Das Tensid, das einen hydrophilen Kopf und einen hydrophoben Schwanz besitzt, sättigt die hydrophoben Bereiche des Gefäßes und hinterlässt eine überwiegend hydrophile Oberfläche, wie von Zhang et al. beschrieben wurde (Zhang et al., 1997). Dadurch kann eine hydrophobe Oberfläche effektiv abgeschirmt werden. Die Anwendung von DDM zur effektiven Reduktion von Proteinverlust wurde durch Huang et al. anhand von Polydimethylsiloxan (PDMS), einem sehr hydrophoben Material, das normalerweise eine starke Adsorption des Proteins BSA (Bovines Serum-Albumin) aufweist, gezeigt. Nach Vorinkubation mit DDM-haltigem Puffer konnte eine deutliche Reduktion der Adsorption beobachtet werden (Huang et al., 2005). Dies wurde auch von Tsai et al. anhand des Einsatzes im Bereich der Einzelzell-Proteomik gezeigt (Tsai et al., 2021), wo die Anzahl identifizierter Proteine deutlich gesteigert werden konnte.

Anschließend wurden die Einflüsse von pH-Wert und Lösungsmittelzusammensetzung auf das Adsorptionsverhalten des hydrophoben Peptids systematisch nach 24-stündiger Inkubation untersucht. In sowohl saurem Milieu (0,1 % Ameisensäure in Wasser, pH 2,7) als auch bei neutralem pH-Wert (Wasser, pH 7) zeigte das Peptid ein vergleichbar starkes Adsorptionsverhalten. Dies deutet darauf hin, dass der zugrunde liegende Adsorptionsmechanismus des hydrophoben Peptids innerhalb dieses pH-Bereichs weitgehend pH-unabhängig ist.

Im Gegensatz dazu konnte in einer Lösung aus 50 % Acetonitril in Wasser keine Adsorption detektiert werden. Dieses Ergebnis belegt die starke Lösungsmittelabhängigkeit der Adsorptionsprozesse. Es existieren Studien, in denen trotz Inkubation von Peptiden in 50 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure in Wasser eine starke Adsorption an Gefäßen beobachtet wurde (Verbeke et al., 2020), dabei handelte es sich jedoch um Glasgefäße und nicht solche aus Polypropylen, weshalb hier vermutlich elektrostatische Wechselwirkungen zu Adsorption führten. Die Unterbrechung hydrophober Wechselwirkungen durch die Zugabe organischer

Lösungsmittel ist ein bekanntes Prinzip und wird unter anderem gezielt in der Umkehrphasen-Chromatographie eingesetzt (Karger & Giese, 1978). Dabei werden organische Lösungsmittel verwendet, um die hydrophoben Wechselwirkungen der Peptide mit der festen Phase gezielt zu unterbrechen. Den positiven Effekt dieser Strategie konnten auch Warwood et al. bei der Quantifizierung von Peptiden beobachten (Warwood et al., 2013). In ihrer Studie verwendeten sie Gefäße aus Polypropylen und führten MRM-Messungen durch. Die Zugabe von Acetonitril in Konzentrationen von 2,5 % bzw. 5 % führte zu einer verbesserten Linearität der Kalibrierkurven und somit zu einer zuverlässigeren Quantifizierung der Peptide. Im *Fast-Assay* zeigte sich in einigen Fällen sogar eine leicht erhöhte Peptidabundanz nach der Inkubation. Dies könnte jedoch auf eine verbesserte Löslichkeit des Peptids in der organisch-wässrigen Lösung zurückzuführen sein.

Besonders hervorzuheben ist, dass modifiziertes PP (m-PP) unabhängig von Peptidtyp, pH-Wert oder Lösungsmittel keine Adsorption zeigte. Dieses bietet somit eine potenziell universelle Lösung zur Vermeidung von Adsorptionsverlusten in analytischen Anwendungen.

Interessante Ergebnisse lieferte auch die Messung der Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-markierten Peptide im Vergleich zu nicht-markierten. Trotz identischer Peptidsequenz zeigte das gelabelte Peptid keine Adsorption mehr, weder in 0,1 % FA in Wasser noch in DPBS. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass Fluoreszenzlabel die nativen Wechselwirkungen von Peptiden mit Oberflächen erheblich verändern können. Möglicherweise schirmt das hydrophile fluoreszierende Label hydrophobe Abschnitte ab oder verändert die räumliche Konformation der Peptide derart, dass die Adsorptionsfähigkeit reduziert wird. Daraus folgt, dass Ergebnisse aus fluoreszenzbasierten Adsorptionsassays nicht ohne Weiteres auf native, ungelabelte Peptide übertragbar sind und der Einsatz der nativen Analyten zu bevorzugen ist.

Die bisherigen Analysen zeigten, dass eine hohe Hydrophobizität (GRAVY-Wert) ein zentraler Prädiktor für das Adsorptionsverhalten von Peptiden an unpolaren PP-Oberflächen ist. Dennoch konnte nicht jedes Adsorptionsverhalten allein durch den GRAVY-Wert erklärt werden. Einzelne Peptide mit sehr hoher Hydrophobizität (GRAVY-Wert > 1) zeigten keine Adsorption, während andere mit moderatem GRAVY-Wert (0,23) oder sogar hydrophilen Eigenschaften (GRAVY-Wert < -2) besonders stark adsorbierten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben der Sequenzzusammensetzung auch strukturelle Eigenschaften der Peptide eine Rolle spielen. Besonders die Ausbildung von Sekundärstrukturen, wie amphiphilen α -Helices oder β -Faltblätter, könnte die Adsorption fördern (Engin & Sayar, 2012; L. Wang et al., 2003). Solche Strukturen exponieren hydrophobe und hydrophile Seitenketten so, dass ganze hydrophile oder hydrophobe Bereiche entstehen.

Ein besonderer Fokus galt dem Peptid SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK, das im APS-Assay und Fast-Assay starke Adsorption an PP-Oberflächen zeigte, obwohl der GRAVY-Wert mit 0,23 im niedrigen hydrophoben Bereich lag. Sowohl die AlphaFold 3-Strukturvorhersage als auch eine Zirkulardichrosimus-Spektroskopie-Messung (CD-Messung) belegten, dass dieses Peptid in strukturinduzierenden Lösungsmitteln wie Trifluorethanol (TFE) (Maroun et al., 2001) eine ausgeprägte amphipathische α -Helix ausbildet. Diese Struktur ermöglicht eine gezielte Exposition hydrophober Seitenketten auf einer Seite der Helix, was die Wechselwirkung mit der unpolaren Oberfläche begünstigen kann und damit die Adsorption trotz moderatem GRAVY-Wert erklärt.

Die CD-Messungen in vier verschiedenen Lösungsmitteln zeigten jedoch eine lösungsmittelabhängige Konformationsdynamik. Während in Wasser und 0,1 % Ameisensäure vor allem β -Faltblatt-Strukturen dominierten (bis zu 59 %), zeigte sich in 50 % Acetonitril ein gemischtes Bild mit ca. 30–40 % Helix-Anteil. In 40 % TFE hingegen lag der α -Helix-Anteil bei über 57 %, bei gleichzeitig minimalem β -Faltblatt-Anteil. Diese Ergebnisse wurden durch verschiedene Sekundärstrukturalgorithmen (*BestSel*, *Selcon*, *Peptide Helicity*) konsistent bestätigt. *Peptide Helicity* ist jedoch in erster Linie auf die Vorhersage von α -Helix-Strukturen ausgelegt, weshalb der Algorithmus leicht abweichende Ergebnisse lieferte, da in diesem Fall überwiegend β -Faltblatt-Strukturen vorlagen. Ergänzend zeigte die temperaturabhängige CD-Messung, dass die β -Faltblattstruktur in Wasser eine hohe thermische Stabilität aufweist.

Die starke Konformationsabhängigkeit in Lösung verdeutlicht, dass das Adsorptionsverhalten nicht nur von der linearen Sequenz, sondern auch maßgeblich von der Sekundärstruktur abhängt, die ein Peptid unter spezifischen Lösungsmittelbedingungen einnimmt. Der Strukturvorhersagealgorithmus wie AlphaFold 3 gibt dabei nur die dominante Konformation unter physiologischen Bedingungen wieder. Dies liegt daran, dass das Modell statische Strukturen vorhersagt, wie sie in der Protein Data Bank (PDB) repräsentiert sind – nicht jedoch die gesamte konformationelle Dynamik in Lösung oder in wechselwirkenden Systemen, wie die Entwickler von AlphaFold 3 selbst feststellen (Abramson et al., 2024). Auch ein weiterer Algorithmus, PepFold 3, speziell zur Vorhersage von Peptidstrukturen entwickelt, unterstützt nur die Vorhersage bei neutralem pH (Lamiable et al., 2016).

Für das hier untersuchte Peptid bedeutet dies, dass wichtige strukturelle Zustände – wie z. B. die Ausbildung von β -Faltblatt-Strukturen in wässrigen Lösungen – nicht zuverlässig von den Algorithmen erfasst werden können, weil die äußeren Bedingungen nicht explizit berücksichtigt werden können.

Neben der Identifikation einer β -Faltblatt-Struktur mittels CD-Spektroskopie wurden für das Peptid SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK mithilfe von AGGRESCAN zwei ausgeprägte

Aggregations-Hotspots vorhergesagt. Diese deuten auf eine erhöhte Tendenz zur Selbstassoziation bzw. Aggregation hin. Im Vergleich zum Referenzpeptid Amyloid- β (1–40) wies das untersuchte Peptid zwar geringere absolute Aggregationswerte auf, zeigte jedoch ein ähnliches Muster aggregationsanfälliger Sequenzabschnitte.

Die Neigung zur Aggregation ist eine typische Eigenschaft β -Faltblatt-reicher Sequenzen und könnte sich zweifach positiv auf die Adsorption auswirken: Einerseits kann es durch Selbstassoziation zu lokal erhöhten Konzentrationen an der Oberfläche kommen, andererseits kann durch geordnete Aggregation die effektive Adsorptionsfläche vergrößert werden (Bellesia & Shea, 2009). In der Literatur finden sich weitere Hinweise auf den Zusammenhang zwischen Sekundärstruktur, Aggregation und Adsorption. So konnten Maltseva et al. (Maltseva et al., 2005) zeigen, dass Amyloid- β (1–40) auf Phospholipid-Monolayern bevorzugt in β -Faltblatt-Konformation adsorbiert, wobei die Adsorption selbst die Ausbildung dieser Struktur begünstigte. Binazadeh et al. (Binazadeh et al., 2013) untersuchten die Adsorption von poly-L-Lysin (PLL) auf Goldoberflächen und stellten fest, dass β -Faltblätter zu höheren Endadsorptionsmengen führten, obwohl α -Helices initial schneller an die Oberfläche binden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Sekundärstruktur eine entscheidende Rolle bei der Peptidadsorption an Oberflächen spielt. Ergänzend zeigten No et al., dass eine Erhöhung der Hydrophobizität durch gezieltes Einbringen hydrophober Aminosäuren in Peptidsequenzen einen stärkeren Einfluss auf die Adsorption von ungeordneten Strukturen als bei α -Helix-Strukturen hatte (No et al., 2022). Ein direkter Vergleich verschiedener Sekundärstrukturen wurde in dieser Studie allerdings nicht durchgeführt, sodass die Ergebnisse vor allem die Rolle der Sequenzzusammensetzung und Oberflächenaffinität unterstreichen.

Abschließend wurde der APS-Assay angepasst und eine Option zur Einstellung einer maximalen Peptidlänge eingefügt, sodass lange Peptide mit größerer Neigung zur Bildung von Sekundärstrukturen bei der Analyse ausgeschlossen werden. Signifikante Zunahmen von Peptidsekundärstrukturen werden erst ab einer Peptidlänge > 15 Aminosäuren beobachtet (Field et al., 2019; Zimm & Bragg, 1959). Auch in der Retentionszeitvorhersage von Peptiden in der Umkehrphasenchromatographie treten Vorhersage-Probleme erst zwischen 15 bis 20 Aminosäuren auf, wie zuvor beschrieben (Al Musaimi et al., 2023; Mant et al., 1988). Die Unterschiede der durchschnittlichen GRAVY-Werte zwischen adsorbierten und nicht adsorbierten Gruppen stiegen nach der Filterung nochmals deutlich an – was die ursprüngliche These der Hydrophobizität als treibende Kraft bei der Adsorption an PP untermauert. Die für den Fast-Assay ausgewählten Peptide sollten ebenfalls nicht länger als 15 Aminosäuren sein, um die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von verschiedenen Sekundärstrukturen mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften zu verringern. Die Begrenzung der

Länge hat auch Vorteile für deren Synthese, da die Ausbildung von Sekundärstrukturen die Herstellung erschweren kann (Paradís-Bas et al., 2016).

Die entwickelten Assays, der APS-Assay und der Fast-Assay, bieten standardisierte Methoden zur qualitativen und quantitativen Charakterisierung von Wechselwirkungen, die in Abhängigkeit von den gewählten Parametern – der Zusammensetzung des Lösungsmittels und der Oberfläche des Probenvorbereitungsmaterials – auf die Analyten einwirken können. Die Ergebnisse des APS-Assays können genutzt werden, um Bedingungen zu identifizieren, die Verluste von Analyten durch Adsorption an Oberflächen während der Probenvorbereitung minimieren. Dies gilt auch für Proteine. Aufgrund der Erkenntnisse über die Qualität der Wechselwirkung kann die Wahrscheinlichkeit der Adsorption von Proteinen vorhergesagt werden. Wird eine signifikante Adsorption der als Sonden genutzten Peptide nachgewiesen, ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass Proteine noch stärker adsorbiert werden. Der APS-Assay ist dadurch limitiert, dass die tryptischen Peptide in dem gewählten Lösungsmittelsystem teilweise löslich sein müssen und dass dieses Lösungsmittelsystem gleichzeitig eine direkte LC-MS-Analyse der gelösten Peptide ermöglicht.

Die Ergebnisse des APS-Assays liefern einen breiten Pool an Peptiden, aus dem gezielt Peptide für den Einsatz im Fast-Assay ausgewählt und synthetisiert werden können. Der Fast-Assay ist eine effiziente Lösung zur Analyse von Wechselwirkungen auf Basis weniger definierter Peptide mit bekannten Konzentrationen. Er eignet sich besonders für Anwendungen, die schnelle Vergleichsmessungen, die Bewertung von Materialmodifikationen oder die Testung von Lösungsmitteln erfordern. Die bei der Zugabe von Detergenzien und organischen Lösungsmitteln beobachteten Adsorptionsänderungen liefern wertvolle Hinweise zur Optimierung der Probenhandhabung, um Probenverluste zu minimieren.

8. Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass der entwickelte APS-Assay und der darauf aufbauende Fast-Assay geeignete Verfahren zur Charakterisierung von Wechselwirkungen zwischen Molekülen und Oberflächen in Abhängigkeit der Lösungsmittel darstellen. Mit ihrer Hilfe lassen sich optimale Kombinationen aus Lösungsmittel und Probenvorbereitungsmaterial identifizieren, um Adsorptionsprozesse und damit verbundene Probenverluste zu minimieren.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bilden eine fundierte Grundlage für die zukünftige Untersuchung und Weiterentwicklung von Probenvorbereitungsmaterialien für die analytische Chemie. Dadurch können Herstellungsprozesse gezielt optimiert und Materialien identifiziert werden, die für die jeweilige Anwendung keine oder minimale Adsorption aufweisen. Besonders im Hinblick auf die zunehmende Miniaturisierung analytischer Systeme, wie sie beispielsweise in der Einzelzell-Proteomik erforderlich ist, gewinnt die Kontrolle von Adsorptionsprozessen weiter an Bedeutung. In zukünftigen Arbeiten soll der APS-Assay zur Untersuchung von Materialien eingesetzt werden, die bisher kaum oder gar nicht im Hinblick auf ihre Adsorptionseigenschaften charakterisiert wurden. Dazu gehören insbesondere Mikrofluidik-Materialien, die bei der Miniaturisierung analytischer Systeme eine zentrale Rolle spielen.

Der vorliegende Datensatz eröffnet die Möglichkeit, prädiktive Modelle zu entwickeln, die das Adsorptionsverhalten von Peptiden in verschiedenen Lösungsmitteln auf Basis ihrer Sequenz vorhersagen können. Durch den Einsatz maschineller Lernverfahren kann ein algorithmisches Modell entstehen, das in der Lage ist, auch für bislang unbekannte Peptide verlässliche Prognosen zur Adsorptionsneigung zu liefern.

Der APS-Assay liefert bereits sehr zuverlässige Ergebnisse basierend auf einer großen Anzahl von Peptiden. Durch den Einsatz moderner *Data-Independent Acquisition*-Strategien auf schnellen Massenspektrometern, die mit Scan-Raten von bis zu 200 Hz sehr schmale Isolationsfenster bei vollständiger *m/z*-Abdeckung ermöglichen (Guzman et al., 2024), ließen sich zukünftig eine noch größere Datenvollständigkeit und umfangreichere Datensätze für die Analyse gewinnen. In Kombination mit KI-gestützter Auswertungssoftware wie CHIMERYS (Frejno et al., 2025), Spectronaut DirectDIA (Bekker-Jensen et al., 2020), MSFragger-DIA (F. Yu et al., 2023) oder DIA-NN (Demichev et al., 2020) konnten bereits deutliche Verbesserungen in der Zahl erfassbarer Peptide und der Quantifizierungsgenauigkeit erzielt werden (Fröhlich et al., 2024). Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, die Leistungsfähigkeit des APS-Assays noch weiter zu steigern.

Zukünftig soll die Praktikabilität des APS-Assays zur Vorhersage von Wechselwirkungen anderer Moleküle, wie beispielsweise Nukleotide, experimentell überprüft werden. Für Lipide ist der APS-Assay aufgrund seiner Limitierungen eher ungeeignet, da sich die Peptide in den hierfür erforderlichen Lösungsmitteln zum großen Teil nicht lösen lassen. Um die Adsorption während der Probenvorbereitung im Bereich der Lipidomik zu untersuchen, könnte stattdessen ein komplexes Lipidreferenzgemisch eingesetzt und ein Assay in ähnlicher Weise wie der in dieser Arbeit vorgestellte APS-Assay durchgeführt werden.

9. Literaturliste

- Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C.-C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Žemgulytė, A., Arvaniti, E., ... Jumper, J. M. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 630(8016), 493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>
- Adamson, A. W., & Gast, A. P. (1997). *Physical chemistry of surfaces* (6. ed). Wiley.
- Aebersold, R., & Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422(6928), 198–207. <https://doi.org/10.1038/nature01511>
- Al Musaimi, O., Valenzo, O. M. M., & Williams, D. R. (2023). Prediction of peptides retention behavior in reversed-phase liquid chromatography based on their hydrophobicity. *Journal of Separation Science*, 46(2), 2200743. <https://doi.org/10.1002/jssc.202200743>
- Amadu, M., & Miadonye, A. (2017). Determination of the Point of Zero Charge pH of Borosilicate Glass Surface Using Capillary Imbibition Method. *International Journal of Chemistry*, 9(3), 67. <https://doi.org/10.5539/ijc.v9n3p67>
- Annesley, T. M. (2003). Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 49(7), 1041–1044. <https://doi.org/10.1373/49.7.1041>
- Baker, H. F., Ridley, R. M., Duchen, L. W., Crow, T. J., & Bruton, C. J. (1994). Induction of β (A4)-amyloid in primates by injection of Alzheimer's disease brain homogenate. *Molecular Neurobiology*, 8(1), 25–39. <https://doi.org/10.1007/BF02778005>
- Behrens, S. H., & Grier, D. G. (2001). The charge of glass and silica surfaces. *The Journal of Chemical Physics*, 115(14), 6716–6721. <https://doi.org/10.1063/1.1404988>
- Beitz, C., Bertsch, T., Hannak, D., Schrammel, W., Einberger, C., & Wehling, M. (1999). Compatibility of plastics with cytotoxic drug solutions—Comparison of polyethylene with other container materials. *International Journal of Pharmaceutics*, 185(1), 113–121. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00175-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00175-1)
- Bekker-Jensen, D. B., Bernhardt, O. M., Hogrebe, A., Martinez-Val, A., Verbeke, L., Gandhi, T., Kelstrup, C. D., Reiter, L., & Olsen, J. V. (2020). Rapid and site-specific deep phosphoproteome profiling by data-independent acquisition without the need for spectral libraries. *Nature Communications*, 11(1), 787. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14609-1>
- Bellesia, G., & Shea, J.-E. (2009). Effect of β -sheet propensity on peptide aggregation. *The Journal of Chemical Physics*, 130(14), 145103. <https://doi.org/10.1063/1.3108461>
- Berg, J. M., Stryer, L., & Tymoczko, J. L. (2015). *Stryer Biochemie* (A. Held, C. Lange, K. Mahlke, G. Maxam, L. Seidler, N. Zellerhoff, B. Häcker, & B. Jarosch, Übers.; 7. Aufl. 2013). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2989-6>
- Binazadeh, M., Zeng, H., & Unsworth, L. D. (2013). Effect of peptide secondary structure on adsorption and adsorbed film properties. *Acta Biomaterialia*, 9(5), 6403–6413.

<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.01.018>

Bjellqvist, B., Hughes, G. J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J. C., Frutiger, S., & Hochstrasser, D. (1993). The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis*, 14(10), 1023–1031. <https://doi.org/10.1002/elps.11501401163>

Bogusz, M. J., Hassan, H., Al-Enazi, E., Ibrahim, Z., & Al-Tufail, M. (2004). Rapid determination of chloramphenicol and its glucuronide in food products by liquid chromatography–electrospray negative ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 807(2), 343–356. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.04.027>

Bouwmeester, R., Gabriels, R., Hulstaert, N., Martens, L., & Degroeve, S. (2021). DeepLC can predict retention times for peptides that carry as-yet unseen modifications. *Nature Methods*, 18(11), 1363–1369. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01301-5>

Boysen, R. I., & Hearn, M. T. W. (2011). High-Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins. In *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry* (S. 167–210). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9783527631841.ch5>

Braak, H., Tredici, K. D., Rüb, U., de Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 24(2), 197–211. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9)

Broto, P., Moreau, G., & Vandycke, C. (1984). Molecular structures: Perception, autocorrelation descriptor and sar studies. Autocorrelation descriptor. *European Journal of Medicinal Chemistry*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Molecular-structures%3A-perception%2C-autocorrelation-Broto-Moreau/bc299a60cc88405bf53a426d00b2e7dc2aa8ceb8>

Brown, P. S., & Bhushan, B. (2016). Durable superoleophobic polypropylene surfaces. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rsta.2016.0193>

Brunauer, S., Emmett, P. H., & Teller, E. (1938). Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society*, 60(2), 309–319. <https://doi.org/10.1021/ja01269a023>

Brynda, E., Drobník, J., Vacík, J., & Kálal, J. (1978). Protein sorption on polymer surfaces measured by fluorescence labels. *Journal of Biomedical Materials Research*, 12(1), 55–65. <https://doi.org/10.1002/jbm.820120106>

Burastero, O., Jones, N. C., Defelipe, L. A., Zavrtanik, U., Hadži, S., Hoffmann, S. V., & Garcia-Alai, M. M. (2025). ChiraKit: An online tool for the analysis of circular dichroism spectroscopy data. *Nucleic Acids Research*, 53(W1), W158–W168. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaf350>

Burkhart, J. M., Schumbrutzki, C., Wortelkamp, S., Sickmann, A., & Zahedi, R. P. (2012). Systematic and quantitative comparison of digest efficiency and specificity reveals the impact of trypsin quality on MS-based proteomics. *Journal of Proteomics*, 75(4), 1454–1462. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.11.016>

Callister, S. J., Barry, R. C., Adkins, J. N., Johnson, E. T., Qian, W., Webb-Robertson, B.-J. M., Smith, R. D., & Lipton, M. S. (2006). Normalization Approaches for Removing Systematic Biases Associated with Mass Spectrometry and Label-Free Proteomics. *Journal of proteome research*, 5(2), 277–286. <https://doi.org/10.1021/pr050300l>

Carraher, C. E. (2000). PHYSICAL CHARACTERIZATION OF POLYMERIC MATERIALS. In C. D. Craver & C. E. Carraher (Hrsg.), *Applied Polymer Science: 21st Century* (S. 851–872). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/B978-008043417-9/50042-8>

Chait, B. T. (2006). Mass Spectrometry: Bottom-Up or Top-Down? *Science*, 314(5796), 65–66. <https://doi.org/10.1126/science.1133987>

Chou, P. Y., & Fasman, G. D. (1974). Prediction of protein conformation. *Biochemistry*, 13(2), 222–245. <https://doi.org/10.1021/bi00699a002>

Christ, R., Siemes, D., Zhao, S., Widera, L., Spangenberg, P., Lill, J., Thiebes, S., Bottek, J., Borgards, L., Pinho, A. G., Silva, N. A., Monteiro, S., Jorch, S. K., Gunzer, M., Siebels, B., Voss, H., Schlüter, H., Shevchuk, O., Chen, J., & Engel, D. R. (2025). Inhibition of tumour necrosis factor alpha by Etanercept attenuates Shiga toxin-induced brain pathology. *Journal of Neuroinflammation*, 22(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12974-025-03356-z>

Cohen Stuart, M. A., Cosgrove, T., & Vincent, B. (1985). Experimental aspects of polymer adsorption at solid/solution interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 24, 143–239. [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(85\)80030-0](https://doi.org/10.1016/0001-8686(85)80030-0)

Coll-Satue, C., Jansman, M. M. T., & Hosta-Rigau, L. (2024). Comparative Evaluation of UV-Vis Spectroscopy-Based Approaches for Hemoglobin Quantification: Method Selection and Practical Insights. *Biomolecules*, 14(9), 1046. <https://doi.org/10.3390/biom14091046>

Conchillo-Solé, O., de Groot, N. S., Avilés, F. X., Vendrell, J., Daura, X., & Ventura, S. (2007). AGGRESCAN: A server for the prediction and evaluation of „hot spots“ of aggregation in polypeptides. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 65. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-65>

Cordeiro, A. L., Rückel, M., Bartels, F., Maitz, M. F., Renner, L. D., & Werner, C. (2019). Protein adsorption dynamics to polymer surfaces revisited—A multisystems approach. *Biointerphases*, 14(5), 051005. <https://doi.org/10.1116/1.5121249>

Corrente, N. J., & Neimark, A. V. (2025). From slit pores to 3D frameworks: Advances in molecular modeling of adsorption in nanoporous carbons. *Advances in Colloid and Interface Science*, 342, 103502. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2025.103502>

Crutchfield, C. A., Thomas, S. N., Sokoll, L. J., & Chan, D. W. (2016). Advances in mass spectrometry-based clinical biomarker discovery. *Clinical Proteomics*, 13, 1. <https://doi.org/10.1186/s12014-015-9102-9>

Dang, Q.-C. L., Phan, D. H., Johnson, A. N., Pasapuleti, M., Alkhaldi, H. A., Zhang, F., & Vik, S. B. (2020). Analysis of Human Mutations in the Supernumerary Subunits of Complex I. *Life*, 10(11), 296. <https://doi.org/10.3390/life10110296>

Demichev, V., Messner, C. B., Vernardis, S. I., Lilley, K. S., & Ralser, M. (2020). DIA-NN: Neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high

throughput. *Nature Methods*, 17(1), 41–44. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0638-x>

Dowell, J. A., Wright, L. J., Armstrong, E. A., & Denu, J. M. (2021). Benchmarking Quantitative Performance in Label-Free Proteomics. *ACS Omega*, 6(4), 2494–2504. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04030>

Draper-Barr, G., Defelipe, L. A., Ruiz-Carrillo, D., Gustavsson, E., Landau, M., & García-Alai, M. (2025). Sla2 is a core interaction hub for clathrin light chain and the Pan1/End3/Sla1 complex. *Structure*, 33(7), 1193-1207.e5. <https://doi.org/10.1016/j.str.2025.04.013>

Duncan, M. R., Lee, J. M., & Warchol, M. P. (1995). Influence of surfactants upon protein/peptide adsorption to glass and polypropylene. *International Journal of Pharmaceutics*, 120(2), 179–188. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)00402-Q](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)00402-Q)

Duong, V.-A., & Lee, H. (2023). Bottom-Up Proteomics: Advancements in Sample Preparation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5350. <https://doi.org/10.3390/ijms24065350>

Ebadi, A., Soltan Mohammadzadeh, J. S., & Khudiev, A. (2009). What is the correct form of BET isotherm for modeling liquid phase adsorption? *Adsorption*, 15(1), 65–73. <https://doi.org/10.1007/s10450-009-9151-3>

Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., & Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 14863–14868. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14863>

Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M., & Wall, R. (1984). Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *Journal of Molecular Biology*, 179(1), 125–142. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(84\)90309-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(84)90309-7)

Engelman, D. M., Steitz, T. A., & Goldman, A. (1986). Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 15, 321–353. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.15.060186.001541>

Engin, O., & Sayar, M. (2012). Adsorption, Folding, and Packing of an Amphiphilic Peptide at the Air/Water Interface. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(7), 2198–2207. <https://doi.org/10.1021/jp206327y>

Falick, A. M., Hines, W. M., Medzihradszky, K. F., Baldwin, M. A., & Gibson, B. W. (1993). Low-mass ions produced from peptides by high-energy collision-induced dissociation in tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 4(11), 882–893. [https://doi.org/10.1016/1044-0305\(93\)87006-X](https://doi.org/10.1016/1044-0305(93)87006-X)

Field, J. K., Euerby, M. R., Lau, J., Thøgersen, H., & Petersson, P. (2019). Investigation into reversed phase chromatography peptide separation systems part I: Development of a protocol for column characterisation. *Journal of Chromatography A*, 1603, 113–129. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.05.038>

Frejno, M., Berger, M. T., Tüshaus, J., Hogrebe, A., Seefried, F., Gruber, M., Samaras, P., Ben Fredj, S., Sukumar, V., Eljagh, L., Bronshtein, I., Mamisashvili, L., Schneider, M., Gessulat, S., Schmidt, T., Kuster, B., Zolg, D. P., & Wilhelm, M. (2025). Unifying the analysis

of bottom-up proteomics data with CHIMERS. *Nature Methods*, 22(5), 1017–1027. <https://doi.org/10.1038/s41592-025-02663-w>

Freundlich, H. (1907). Über die Adsorption in Lösungen. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 57U(1), 385–470. <https://doi.org/10.1515/zpch-1907-5723>

Ghose, A. K., Viswanadhan, V. N., & Wendoloski, J. J. (1998). Prediction of Hydrophobic (Lipophilic) Properties of Small Organic Molecules Using Fragmental Methods: An Analysis of ALOGP and CLOGP Methods. *The Journal of Physical Chemistry A*, 102(21), 3762–3772. <https://doi.org/10.1021/jp980230o>

Godbole, S., Voß, H., Gocke, A., Schlumbohm, S., Schumann, Y., Peng, B., Mynarek, M., Rutkowski, S., Dottermusch, M., Dorostkar, M. M., Korshunov, A., Mair, T., Pfister, S. M., Kwiatkowski, M., Hotze, M., Neumann, P., Hartmann, C., Weis, J., Liesche-Starnecker, F., ... Neumann, J. E. (2024). Multiomic profiling of medulloblastoma reveals subtype-specific targetable alterations at the proteome and N-glycan level. *Nature Communications*, 15(1), 6237. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-50554-z>

Graveland, G. A., Williams, R. S., & DiFiglia, M. (1985). Evidence for Degenerative and Regenerative Changes in Neostratal Spiny Neurons in Huntington's Disease. *Science*, 227(4688), 770–773. <https://doi.org/10.1126/science.3155875>

Gu, Y., & Li, D. (2000). The ζ -Potential of Glass Surface in Contact with Aqueous Solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 226(2), 328–339. <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.6827>

Gupta, A., Sharma, V., Sharma, K., Kumar, V., Choudhary, S., Mankotia, P., Kumar, B., Mishra, H., Moulick, A., Ekielski, A., & Mishra, P. K. (2021). A Review of Adsorbents for Heavy Metal Decontamination: Growing Approach to Wastewater Treatment. *Materials*, 14(16), 4702. <https://doi.org/10.3390/ma14164702>

Guzman, U. H., Martinez-Val, A., Ye, Z., Damoc, E., Arrey, T. N., Pashkova, A., Renuse, S., Denisov, E., Petzoldt, J., Peterson, A. C., Harking, F., Østergaard, O., Rydbirk, R., Aznar, S., Stewart, H., Xuan, Y., Hermanson, D., Horning, S., Hock, C., ... Olsen, J. V. (2024). Ultra-fast label-free quantification and comprehensive proteome coverage with narrow-window data-independent acquisition. *Nature Biotechnology*, 42(12), 1855–1866. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-02099-7>

Harris, L., Fondrie, W. E., Oh, S., & Noble, W. S. (2023). Evaluating Proteomics Imputation Methods with Improved Criteria. *Journal of proteome research*, 22(11), 3427–3438. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.3c00205>

Huang, B., Wu, H., Kim, S., & Zare, R. N. (2005). Coating of poly(dimethylsiloxane) with n-dodecyl- β -D-maltoside to minimize nonspecific protein adsorption. *Lab on a Chip*, 5(10), 1005–1007. <https://doi.org/10.1039/B509251E>

Hughes, C. S., Moggridge, S., Müller, T., Sorensen, P. H., Morin, G. B., & Krijgsveld, J. (2019). Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. *Nature Protocols*, 14(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0082-x>

Illum, L., & Bundgaard, H. (1982). Sorption of drugs by plastic infusion bags. *International*

Journal of Pharmaceutics, 10(4), 339–351. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(82\)90168-5](https://doi.org/10.1016/0378-5173(82)90168-5)

Jhaveri, J. H., & Murthy, Z. V. P. (2016). A comprehensive review on anti-fouling nanocomposite membranes for pressure driven membrane separation processes. *Desalination*, 379, 137–154. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2015.11.009>

Jiang, Y., Rex, D. A. B., Schuster, D., Neely, B. A., Rosano, G. L., Volkmar, N., Momenzadeh, A., Peters-Clarke, T. M., Egbert, S. B., Kreimer, S., Doud, E. H., Crook, O. M., Yadav, A. K., Vanuopadath, M., Hegeman, A. D., Mayta, M. L., Duboff, A. G., Riley, N. M., Moritz, R. L., & Meyer, J. G. (2024). Comprehensive Overview of Bottom-Up Proteomics Using Mass Spectrometry. *ACS Measurement Science Au*, 4(4), 338–417. <https://doi.org/10.1021/acsmeasurescua.3c00068>

Jin, Y., Yi, Y., & Yeung, B. (2022). Mass spectrometric analysis of protein deamidation – A focus on top-down and middle-down mass spectrometry. *Methods*, 200, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.08.002>

Juds, C., Schmidt, J., Weller, M. G., Lange, T., Beck, U., Conrad, T., & Börner, H. G. (2020). Combining Phage Display and Next-Generation Sequencing for Materials Sciences: A Case Study on Probing Polypropylene Surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 142(24), 10624–10628. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c03482>

Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>

Kardos, J., Nyiri, M. P., Moussong, É., Wien, F., Molnár, T., Murvai, N., Tóth, V., Vadászi, H., Kun, J., Jamme, F., & Micsonai, A. (2025). Guide to the structural characterization of protein aggregates and amyloid fibrils by CD spectroscopy. *Protein Science*, 34(3), e70066. <https://doi.org/10.1002/pro.70066>

Karger, B. L., & Giese, R. W. (1978). Reversed Phase Liquid Chromatography and Its Application to Biochemistry. *Analytical Chemistry*, 50(12), 1048A-1073A. <https://doi.org/10.1021/ac50034a717>

Kim, J. (2020). Systematic approach to characterize the dynamics of protein adsorption on the surface of biomaterials using proteomics. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 188, 110756. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110756>

Kraut, A., Marcellin, M., Adrait, A., Kuhn, L., Louwagie, M., Kieffer-Jaquinod, S., Lebert, D., Masselon, C. D., Dupuis, A., Bruley, C., Jaquinod, M., Garin, J., & Gallagher-Gambarelli, M. (2009). Peptide Storage: Are You Getting the Best Return on Your Investment? Defining Optimal Storage Conditions for Proteomics Samples. *Journal of Proteome Research*, 8(7), 3778–3785. <https://doi.org/10.1021/pr900095u>

Kuipers, B. J. H., & Gruppen, H. (2007). Prediction of molar extinction coefficients of proteins and peptides using UV absorption of the constituent amino acids at 214 nm to enable quantitative reverse phase high-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5445–5451. <https://doi.org/10.1021/jf070337l>

Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of

a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105–132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)

Laguerre, M., Saux, M., Dubost, J. P., & Carpy, A. (1997). MLPP: A Program for the Calculation of Molecular Lipophilicity Potential in Proteins. *Pharmacy and Pharmacology Communications*, 3(5–6), 217–222. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1997.tb00257.x>

Lamiable, A., Thévenet, P., Rey, J., Vavrusa, M., Derreumaux, P., & Tufféry, P. (2016). PEP-FOLD3: Faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic Acids Research*, 44(Web Server issue), W449–W454. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw329>

Langmuir, I. (1918). THE ADSORPTION OF GASES ON PLANE SURFACES OF GLASS, MICA AND PLATINUM. *Journal of the American Chemical Society*, 40(9), 1361–1403. <https://doi.org/10.1021/ja02242a004>

Laskowski, J., & Kitchener, J. A. (1969). The hydrophilic—Hydrophobic transition on silica. *Journal of Colloid and Interface Science*, 29(4), 670–679. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(69\)90219-7](https://doi.org/10.1016/0021-9797(69)90219-7)

Latour, R. A. (2015). The langmuir isotherm: A commonly applied but misleading approach for the analysis of protein adsorption behavior. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(3), 949–958. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35235>

Law, A. S., Hafen, P. S., & Brault, J. J. (2022). Liquid chromatography method for simultaneous quantification of ATP and its degradation products compatible with both UV-Vis and mass spectrometry. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1206, 123351. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123351>

Lazar, C., Gatto, L., Ferro, M., Bruley, C., & Burger, T. (2016). Accounting for the Multiple Natures of Missing Values in Label-Free Quantitative Proteomics Data Sets to Compare Imputation Strategies. *Journal of Proteome Research*, 15(4), 1116–1125. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00981>

LeVan, M. D., & Vermeulen, T. (1981). Binary Langmuir and Freundlich isotherms for ideal adsorbed solutions. *The Journal of Physical Chemistry*, 85(22), 3247–3250. <https://doi.org/10.1021/j150622a009>

Lex, A., Gehlenborg, N., Strobelt, H., Vuillemot, R., & Pfister, H. (2014). UpSet: Visualization of Intersecting Sets. *IEEE Transactions on Visualization and Computer Graphics*, 20(12), 1983–1992. <https://doi.org/10.1109/TVCG.2014.2346248>

Liu, M., & Dongre, A. (2021). Proper imputation of missing values in proteomics datasets for differential expression analysis. *Briefings in Bioinformatics*, 22(3), bbaa112. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa112>

Maes, K., Smolders, I., Michotte, Y., & Van Eeckhaut, A. (2014). Strategies to reduce aspecific adsorption of peptides and proteins in liquid chromatography-mass spectrometry based bioanalyses: An overview. *Journal of Chromatography. A*, 1358, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.072>

Maltseva, E., Kerth, A., Blume, A., Möhwald, H., & Brezesinski, G. (2005). Adsorption of Amyloid β (1–40) Peptide at Phospholipid Monolayers. *ChemBioChem*, 6(10), 1817–1824. <https://doi.org/10.1002/cbic.200500116>

Mant, C. T., Burke, T. W. L., Black, J. A., & Hodges, R. S. (1988). Effect of peptide chain length on peptide retention behaviour in reversed-phase chromatography. *Journal of Chromatography A*, 458, 193–205. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)90564-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)90564-8)

Manzi, B. M., Werner, M., Ivanova, E. P., Crawford, R. J., & Baulin, V. A. (2019). Simulations of Protein Adsorption on Nanostructured Surfaces. *Scientific Reports*, 9(1), 4694. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40920-z>

Maroun, R. G., Gayet, S., Benleulmi, M. S., Porumb, H., Zargarian, L., Merad, H., Leh, H., Mouscadet, J.-F., Troalen, F., & Fermandjian, S. (2001). Peptide Inhibitors of HIV-1 Integrase Dissociate the Enzyme Oligomers. *Biochemistry*, 40(46), 13840–13848. <https://doi.org/10.1021/bi011328n>

Meng, E. C., Goddard, T. D., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Pearson, Z. J., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2023). UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. *Protein Science*, 32(11), e4792. <https://doi.org/10.1002/pro.4792>

Mesri, E. A., Cesarman, E., & Boshoff, C. (2010). Kaposi's sarcoma herpesvirus/ Human herpesvirus-8 (KSHV/HHV8), and the oncogenesis of Kaposi's sarcoma. *Nature reviews. Cancer*, 10(10), 707–719. <https://doi.org/10.1038/nrc2888>

Micsonai, A., Bulyáki, É., & Kardos, J. (2021). BeStSel: From Secondary Structure Analysis to Protein Fold Prediction by Circular Dichroism Spectroscopy. In Y. W. Chen & C.-P. B. Yiu (Hrsg.), *Structural Genomics: General Applications* (S. 175–189). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0892-0_11

Mizutani, T., & Mizutani, A. (1978). Estimation of Adsorption of Drugs and Proteins on Glass Surfaces with Controlled Pore Glass as a Reference. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67(8), 1102–1105. <https://doi.org/10.1002/jps.2600670820>

Motta, M. A., Mulko, L., Marin, E., Larrañaga, A., & Calderón, M. (2024). Polypeptide-based multilayer nanoarchitectures: Controlled assembly on planar and colloidal substrates for biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 331, 103248. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2024.103248>

Mou, X., Du, H., Qiao, G., & Li, J. (2025). Evaluation of imputation and imputation-free strategies for differential abundance analysis in metaproteomics data. *Briefings in Bioinformatics*, 26(2), bbaf141. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaf141>

Murphy, E. L., Joy, A. P., Ouellette, R. J., & Barnett, D. A. (2021). Improved intact peptide and protein quantitation by LC-MS: Battling the deleterious effects of analyte adsorption. *Analytical Science Advances*, 2(5–6), 299–307. <https://doi.org/10.1002/ansa.202000102>

No, Y. H., Kim, N. H., Zafar, M. S., Park, S. H., Lee, J., Chae, H., Yun, W. S., Kim, Y. D., & Kim, Y. H. (2022). Effect of Secondary Structures on the Adsorption of Peptides onto Hydrophobic Solid Surfaces Revealed by SALDI-TOF and MD Simulations. *ACS Omega*, 7(48), 43492–43498. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c03934>

Norde, W. (1986). Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. *Advances in Colloid and Interface Science*, 25, 267–340. [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(86\)80012-4](https://doi.org/10.1016/0001-8686(86)80012-4)

Oldham, W. M., & Hamm, H. E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 60–71. <https://doi.org/10.1038/nrm2299>

Onizhuk, M. O., Panteleimonov, A. V., Kholin, Yu. V., & Ivanov, V. V. (2018). Dissociation Constants of Silanol Groups of Silic Acids: Quantum Chemical Estimations. *Journal of Structural Chemistry*, 59(2), 261–271. <https://doi.org/10.1134/S0022476618020026>

Pan, S., Aebersold, R., Chen, R., Rush, J., Goodlett, D. R., McIntosh, M. W., Zhang, J., & Brentnall, T. A. (2009). Mass spectrometry based targeted protein quantification: Methods and applications. *Journal of proteome research*, 8(2), 787–797. <https://doi.org/10.1021/pr800538n>

Paradís-Bas, M., Tulla-Puche, J., & Albericio, F. (2016). The road to the synthesis of „difficult peptides“. *Chemical Society Reviews*, 45(3), 631–654. <https://doi.org/10.1039/c5cs00680e>

Patwardhan, S. V., Emami, F. S., Berry, R. J., Jones, S. E., Naik, Rajesh. R., Deschaume, O., Heinz, H., & Perry, C. C. (2012). Chemistry of Aqueous Silica Nanoparticle Surfaces and the Mechanism of Selective Peptide Adsorption. *Journal of the American Chemical Society*, 134(14), 6244–6256. <https://doi.org/10.1021/ja211307u>

Pereira-Veiga, T., Yáñez-Gómez, C., Pekkarinen, A., Abuín, C., Blechner, C., González-Conde, M., Mess, C., Vidal-y-Sy, S., Moustafa, A., Siebels, B., Dávila-Ibáñez, A. B., Cabezas-Sainz, P., Santos, M., Sánchez, L., Gorgulho, J., Götze, J., Meißner, K., Cueva, J., Palacios, P., ... Costa, C. (2025). Red blood cell-tumor cell interactions promote tumor cell progression. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 44, 134. <https://doi.org/10.1186/s13046-025-03376-w>

Perez-Riverol, Y., Bai, J., Bandla, C., García-Seisdedos, D., Hewapathirana, S., Kamatchinathan, S., Kundu, D. J., Prakash, A., Frericks-Zipper, A., Eisenacher, M., Walzer, M., Wang, S., Brazma, A., & Vizcaíno, J. A. (2022). The PRIDE database resources in 2022: A hub for mass spectrometry-based proteomics evidences. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D543–D552. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1038>

Puddu, V., & Perry, C. C. (2012). Peptide Adsorption on Silica Nanoparticles: Evidence of Hydrophobic Interactions. *ACS Nano*, 6(7), 6356–6363. <https://doi.org/10.1021/nn301866q>

R Core Team. (2022). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

Rabe, M., Verdes, D., & Seeger, S. (2011). Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 162(1), 87–106. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.12.007>

Roepstorff, P., & Fohlman, J. (1984). Letter to the editors. *Biomedical Mass Spectrometry*, 11(11), 601–601. <https://doi.org/10.1002/bms.1200111109>

Rose, G. D., Geselowitz, A. R., Lesser, G. J., Lee, R. H., & Zehfus, M. H. (1985). Hydrophobicity of amino acid residues in globular proteins. *Science (New York, N.Y.)*,

229(4716), 834–838. <https://doi.org/10.1126/science.4023714>

Roth, C. M., Neal, B. L., & Lenhoff, A. M. (1996). Van der Waals interactions involving proteins. *Biophysical Journal*, 70(2), 977–987. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79641-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79641-8)

Schlüter, H., & Zidek, W. (1993). Application of non-size-related separation effects to the purification of biologically active substances with a size-exclusion gel. *Journal of Chromatography A*, 639(1), 17–22. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)83083-5](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)83083-5)

Schrader, A. M., Monroe, J. I., Sheil, R., Dobbs, H. A., Keller, T. J., Li, Y., Jain, S., Shell, M. S., Israelachvili, J. N., & Han, S. (2018). Surface chemical heterogeneity modulates silica surface hydration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(12), 2890–2895. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722263115>

Siebels, B., Moritz, M., Hübner, D., Gocke, A., Riedner, M., Voß, H., & Schlüter, H. (2024). Assay for Characterizing Adsorption-Properties of Surfaces (APS). *Chemistry – A European Journal*, 30(68), e202403000. <https://doi.org/10.1002/chem.202403000>

Silva, J. C., Gorenstein, M. V., Li, G.-Z., Vissers, J. P. C., & Geromanos, S. J. (2006). Absolute Quantification of Proteins by LCMSE. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(1), 144–156. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500230-MCP200>

Smeitink, J., Sengers, R., Trijbels, F., & van den Heuvel, L. (2001). Human NADH:Ubiquinone Oxidoreductase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 33(3), 259–266. <https://doi.org/10.1023/A:1010743321800>

Sperling, K. (2001). From proteomics to genomics. *Electrophoresis*, 22(14), 2835–2837. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200108\)22:14<2835::AID-ELPS2835>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200108)22:14<2835::AID-ELPS2835>3.0.CO;2-3)

Sreerama, N., Venyaminov, S. Yu., & Woody, R. W. (2000). Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Inclusion of Denatured Proteins with Native Proteins in the Analysis. *Analytical Biochemistry*, 287(2), 243–251. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4879>

Stahl-Zeng, J., Lange, V., Ossola, R., Eckhardt, K., Krek, W., Aebersold, R., & Domon, B. (2007). High sensitivity detection of plasma proteins by multiple reaction monitoring of N-glycosites. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 6(10), 1809–1817. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700132-MCP200>

Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), 15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>

Sun, B., & Kumar, S. (2022). Protein Adsorption Loss—The Bottleneck of Single-Cell Proteomics. *Journal of Proteome Research*, 21(8), 1808–1815. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.2c00317>

Svozil, J., & Baerenfaller, K. (2017). Chapter Twenty-One—A Cautionary Tale on the Inclusion of Variable Posttranslational Modifications in Database-Dependent Searches of Mass

Spectrometry Data. In A. K. Shukla (Hrsg.), *Methods in Enzymology* (Bd. 586, S. 433–452). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.11.007>

Swenson, H., & Stadie, N. P. (2019). Langmuir's Theory of Adsorption: A Centennial Review. *Langmuir*, 35(16), 5409–5426. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b00154>

Switzer, L., Giera, M., & Niessen, W. M. A. (2013). Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments. *Journal of Proteome Research*, 12(3), 1067–1077. <https://doi.org/10.1021/pr301201x>

Tamura, T., Lee, D. H., Osaka, F., Fujiwara, T., Shin, S., Chung, C. H., Tanaka, K., & Ichihara, A. (1991). Molecular cloning and sequence analysis of cDNAs for five major subunits of human proteasomes (multi-catalytic proteinase complexes). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1089(1), 95–102. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(91\)90090-9](https://doi.org/10.1016/0167-4781(91)90090-9)

Thermo Fisher Scientific. (2013). *Bedienungsanleitung Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000-Serie, WPS-3000 Autosampler*. <https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/man-4828-2201-ultimate-3000-wps-sl-rs-man48282201-de.pdf>

Tsai, C.-F., Zhang, P., Scholten, D., Martin, K., Wang, Y.-T., Zhao, R., Chrisler, W. B., Patel, D. B., Dou, M., Jia, Y., Reduzzi, C., Liu, X., Moore, R. J., Burnum-Johnson, K. E., Lin, M.-H., Hsu, C.-C., Jacobs, J. M., Kagan, J., Srivastava, S., ... Shi, T. (2021). Surfactant-assisted one-pot sample preparation for label-free single-cell proteomics. *Communications Biology*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01797-9>

Uehara, S., Kawabe, T., Wood, P., & Tsuji, O. (2016). UV/ozone Surface Modification for Long-term Stable Hydrophilic Surface of Polymer Microfluidic Devices. *MRS Advances*, 1(11), 743–748. <https://doi.org/10.1557/adv.2016.167>

Vámos, C., Füredi, M., Hórvölgyi, Z., Krafcsik, O., Kiss, G., Bárány, T., & Marosfői, B. B. (2024). Analysis of time-dependent hydrophobic recovery on plasma-treated superhydrophobic polypropylene using XPS and wettability measurements. *Scientific Reports*, 14(1), 23715. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-72573-y>

van Midwoud, P. M., Rieux, L., Bischoff, R., Verpoorte, E., & Niederländer, H. A. G. (2007). Improvement of Recovery and Repeatability in Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis of Peptides. *Journal of Proteome Research*, 6(2), 781–791. <https://doi.org/10.1021/pr0604099>

Verbeke, F., Bracke, N., Debuinne, N., Wynendaele, E., & De Spiegeleer, B. (2020). LC–MS Compatible Antiadsorption Diluent for Peptide Analysis. *Analytical Chemistry*, 92(2), 1712–1719. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01840>

Vogler, E. A. (2012). Protein adsorption in three dimensions. *Biomaterials*, 33(5), 1201–1237. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.059>

Wang, L., Atkinson, D., & Small, D. M. (2003). Interfacial Properties of an Amphipathic α -Helix Consensus Peptide of Exchangeable Apolipoproteins at Air/Water and Oil/Water Interfaces*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 37480–37491. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303133200>

Wang, Y., Guan, Z.-Y., Shi, S.-W., Jiang, Y.-R., Zhang, J., Yang, Y., Wu, Q., Wu, J., Chen, J.-B., Ying, W.-X., Xu, Q.-Q., Fan, Q.-X., Wang, H.-F., Zhou, L., Wang, L., Fang, J., Pan, J.-Z., & Fang, Q. (2024). Pick-up single-cell proteomic analysis for quantifying up to 3000 proteins in a Mammalian cell. *Nature Communications*, 15(1), 1279. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45659-4>

Warwood, S., Byron, A., Humphries, M. J., & Knight, D. (2013). The effect of peptide adsorption on signal linearity and a simple approach to improve reliability of quantification. *Journal of Proteomics*, 85, 160–164. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.04.034>

Wedler, V., Quinones, D., Peisert, H., & Schäffer, E. (2022). A Quick and Reproducible Silanization Method by Using Plasma Activation for Hydrophobicity-Based Kinesin Single Molecule Fluorescence–Microscopy Assays. *Chemistry – A European Journal*, 28(64), e202202036. <https://doi.org/10.1002/chem.202202036>

Weikart, C. M., Klibanov, A. M., Breeland, A. P., Taha, A. H., Maurer, B. R., & Martin, S. P. (2017). Plasma-Treated Microplates with Enhanced Protein Recoveries and Minimized Extractables. *Slas Technology*, 22(1), 98–105. <https://doi.org/10.1177/2211068216666258>

Weiβ, N., Wente, W., & Müller, P. (2024). *Eppendorf LoBind®: Evaluation of Protein Recovery in Eppendorf Protein LoBind® Tubes and Plates*.

Winzen, S., Koynov, K., Landfester, K., & Mohr, K. (2016). Fluorescence labels may significantly affect the protein adsorption on hydrophilic nanomaterials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 147, 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.07.057>

Wyrzykowska, E., Balicki, M., Anusiewicz, I., Rouse, I., Lobaskin, V., Skurski, P., & Puzyn, T. (2025). Predicting biomolecule adsorption on nanomaterials: A hybrid framework of molecular simulations and machine learning. *Nanoscale*, 17(17), 11004–11015. <https://doi.org/10.1039/D4NR05366D>

Xu, S., Hu, E., Cai, Y., Xie, Z., Luo, X., Zhan, L., Tang, W., Wang, Q., Liu, B., Wang, R., Xie, W., Wu, T., Xie, L., & Yu, G. (2024). Using clusterProfiler to characterize multiomics data. *Nature Protocols*, 19(11), 3292–3320. <https://doi.org/10.1038/s41596-024-01020-z>

Yang, L., He, Y., Kong, Q., Zhang, W., Xi, D., Mao, H., & Deng, W. (2010). Isolation, nucleotide identification and tissue expression of three novel ovine genes—SLC25A4, SLC25A5 and SLC25A6. *Molecular Biology Reports*, 37(6), 2743–2748. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9812-z>

Yu, F., Teo, G. C., Kong, A. T., Fröhlich, K., Li, G. X., Demichev, V., & Nesvizhskii, A. I. (2023). Analysis of DIA proteomics data using MSFragger-DIA and FragPipe computational platform. *Nature Communications*, 14(1), 4154. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39869-5>

Yu, Y., Krishnan, N. M. A., Smedskjaer, M. M., Sant, G., & Bauchy, M. (2018). The hydrophilic-to-hydrophobic transition in glassy silica is driven by the atomic topology of its surface. *The Journal of Chemical Physics*, 148(7), 074503. <https://doi.org/10.1063/1.5010934>

Zavrtanik, U., Lah, J., & Hadži, S. (2024). Estimation of Peptide Helicity from Circular Dichroism Using the Ensemble Model. *The Journal of Physical Chemistry B*, 128(11), 2652–2663. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.3c07511>

Zhang, L., Somasundaran, P., & Maltesh, C. (1997). Adsorption of n -Dodecyl-beta-d - maltoside on Solids. *Journal of Colloid and Interface Science*, 191(1), 202–208. <https://doi.org/10.1006/jcis.1997.4923>

Zheng, S., & Doucette, A. A. (2016). Preventing N- and O-formylation of proteins when incubated in concentrated formic acid. *PROTEOMICS*, 16(7), 1059–1068. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500366>

Zhou, Y., Fang, Z., Zhang, Y., Li, T., & Liu, F. (2024). Surface Hydrophilic Modification of Polypropylene by Nanosecond Pulsed Ar/O₂ Dielectric Barrier Discharge. *Materials (Basel, Switzerland)*, 18(1), 95. <https://doi.org/10.3390/ma18010095>

Zhuravlev, L. T. (1987). Concentration of hydroxyl groups on the surface of amorphous silicas. *Langmuir*, 3(3), 316–318. <https://doi.org/10.1021/la00075a004>

Zhuravlev, L. T. (2000). The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 173(1–3), 1–38. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00556-2](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00556-2)

Zimm, B. H., & Bragg, J. K. (1959). Theory of the Phase Transition between Helix and Random Coil in Polypeptide Chains. *The Journal of Chemical Physics*, 31(2), 526–535. <https://doi.org/10.1063/1.1730390>

10. Anhang

10.1. Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS

Chemikalie	H-Satz	P-Satz	Piktogramme
Ameisensäure	H226, H290, H302, H314, H331	P210, P280, P303+P361+P353, P304+P340, P305+P351+P338, P310	
Acetonitril	H225, H302+H312+H332, H319	P210, P280, P305+P351+P338, P403+P235	
Trifluorethanol	H226, H301+H331, H318, H360F, H373	P201, P210, P280, P301+P310, P304+P340, P305+P351+P338	

10.2. APS-Assay: Python-basiertes Skript

Block 1: Meta-Informationen und Versionen

APS-Assay-Skript

Beschreibung:

Dieses Skript dient der automatisierten Auswertung im APS-Assays.

Autorin: Bente Katharina Siebels

Institut: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, 2025

Version: 2.0

Getestet mit:

Python 3.10.9

pandas 1.5.3

numpy 1.23.5

matplotlib 3.7.0

seaborn 0.12.2

scipy 1.10.0

statsmodels 0.13.5

peptides 0.5.0

Block 2: Import benötigter Bibliotheken

In diesem Block werden alle benötigten Python-Bibliotheken importiert. Sie dienen der Datenverarbeitung, Statistikberechnung, Visualisierung sowie Dateioperationen.

```
import pandas as pd
import numpy as np
import matplotlib
matplotlib.use('agg')
import matplotlib.pyplot as plt
import seaborn as sns
from scipy import stats
import os
import sys
from statsmodels.stats.multitest import multipletests
from peptides import Peptide
```

Block 3: Benutzereinstellungen

Dieser Block definiert alle Parameter, die der Benutzer anpassen kann, wie zum Beispiel p-Wert-Schwellen, Präfixe der Vergleichsgruppen, den pH-Wert für die Ladungsberechnung und einen optionalen Längenfilter für Peptide. Durch diese Trennung von Parametern und Analysecode ist das Skript flexibel und einfach anpassbar.

```

pvalue_cutoff = 0.05      # p-Wert-Schwelle
fdr_cutoff = 0.1          # Schwelle für Multiples Testen (FDR, adjusted p-value)
fold_change_cutoff = -1   # log2 Fold-Change Schwelle
group_1_prefix = "1"      # Prefix für Gruppe 1 (z.B. 0h)
group_2_prefix = "2"      # Prefix für Gruppe 2 (z.B. 24h)
pH = 2.7                 # pH für Ladungsberechnung

# Optional: Peptid-Längenfilter
apply_length_filter = True # True → Peptide > max_length werden entfernt
max_length = 15

```

Block 4: Einlesen der Daten

In diesem Block werden die Peptid-Daten aus einer Excel-Datei eingelesen. Anschließend werden die Werte bereinigt, indem ungültige Werte oder Nullen in NaN umgewandelt werden. Dies stellt sicher, dass die Daten für die weiteren Analysen konsistent und korrekt sind.

```

file_path = "/path-to-file"
directory = os.path.dirname(file_path)
base_name = os.path.basename(file_path)
base_name, extension = os.path.splitext(base_name)

try:
    data = pd.read_excel(file_path)
except IOError as err:
    sys.stderr.write(f'{err}\n')
    sys.exit(1)

def sanitize_value(val):
    try:
        val = float(val)
        return np.nan if val == 0 else val
    except:
        return np.nan

abundance_columns = [col for col in data.columns if col not in ["Peptides", "Modifications"]]
data[abundance_columns] = data[abundance_columns].applymap(sanitize_value)

```

Block 5: Präprozessierung und Filtern auf relevante Peptide für den APS-Assay

Dieser Block bereitet die Daten für die Analyse vor. Zunächst werden die Abundanzwerte logarithmiert (log₂-Transformation), danach werden Duplikate entfernt, unerwünschte Modifikationen gefiltert und optional ein Längenfilter auf Peptide angewendet. Dadurch wird sichergestellt, dass nur valide und relevante Daten in die statistische Analyse eingehen. Zusätzlich können Peptide, die in Gruppe 2 („24h“) nicht mehr detektiert werden, angezeigt werden. Alle Zwischenergebnisse werden automatisiert als Excel-Tabellen abgespeichert.

```

# 1. Log2-Transformation
data[abundance_columns] = data[abundance_columns].applymap(lambda x: np.log2(x + 1e-9))

# 2. Entferne Peptide, die mehrfach vorkommen (aufgrund von Modifikationen)
data["Peptides"] = data["Peptides"].astype(str).str.strip().str.upper()
duplicates = data["Peptides"].duplicated(keep=False)
data = data[~duplicates]
print(f"Unique peptides: {data.shape[0]}")
save_intermediate(data, "after_unique_peptide_filter")

# 3. Entferne modifizierte Peptide (hier: oxidation, pyro-glu, formyl)
mods_to_remove = ["oxidation", "pyro-glu", "formyl"]
pattern = "|".join(mods_to_remove)
mask_mods = data["Modifications"].str.contains(pattern, case=False, na=False)
mods_removed = mask_mods.sum()
data = data[~mask_mods]
print(f"Removed {mods_removed} peptides with unwanted modifications")
save_intermediate(data, "after_modification_removal")

# 4. Optional: Entferne Peptide mit Länge größer als max_length
if apply_length_filter:
    before_len = data.shape[0]
    data = data[data["Peptides"].str.len() <= max_length]
    after_len = data.shape[0]
    print(f"Length filter applied: removed {before_len - after_len} peptides with length > {max_length}")
    save_intermediate(data, f"after_length_filter_max{max_length}")

# 5. Filtern und Reduktion auf Peptide nach Vorkommen in 100% der Replikate Gruppe 1, 0 % in Gruppe 2.
group_0h_cols = [col for col in data.columns if col.startswith(group_1_prefix)]
group_24h_cols = [col for col in data.columns if col.startswith(group_2_prefix)]
valid_0h = data[group_0h_cols].notna().all(axis=1)
absent_in_24h = data[group_24h_cols].isna().all(axis=1)
present_0h_absent_24h = valid_0h & absent_in_24h

print(f"Peptides present in all 0h samples: {valid_0h.sum()}")
print(f"Peptides absent in all 24h samples: {absent_in_24h.sum()}")
print(f"Peptides present in all 0h AND absent in all 24h: {present_0h_absent_24h.sum()")

special_peptides = data.loc[present_0h_absent_24h].copy()
save_intermediate(special_peptides,
f"after_0h_24h_filter_{group_2_prefix}_vs_{group_1_prefix}")

# 6. Filtern und Reduktion auf Peptide, die in 100% der Replikate von Gruppe 1 und Gruppe 2 sind.
before_valid_filter_count = data.shape[0]
valid_100_mask = data[abundance_columns].notnull().all(axis=1)
data = data[valid_100_mask]
print(f"Peptides with 100% valid values: {data.shape[0]} (removed {before_valid_filter_count - data.shape[0]})")
save_intermediate(data, "after_100percent_valid_filter")

```

Block 6: Funktionen zur Berechnung von Peptid-Eigenschaften

Hier werden Funktionen definiert, um zusätzliche Peptidmerkmale zu berechnen. Dazu gehören der GRAVY-Wert, der die Hydrophobie oder Hydrophilie eines Peptids angibt (hier nach Kyte und Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982)), sowie der Ladungszustand, der die Nettoladung bei gegebenem pH-Wert berechnet nach Bjellqvist (Bjellqvist et al., 1993).

```
def calculate_gravy_number(peptide):  
    aa_gravy = {'A':1.8,'C':2.5,'D':-3.5,'E':-3.5,'F':2.8,'G':-0.4,  
               'H':-3.2,'I':4.5,'K':-3.9,'L':3.8,'M':1.9,'N':-3.5,  
               'P':-1.6,'Q':-3.5,'R':-4.5,'S':-0.8,'T':-0.7,'V':4.2,'W':-0.9,'Y':-1.3}  
    return sum(aa_gravy.get(aa,0) for aa in peptide)/len(peptide)  
  
def calculate_charge(peptide, ph=pH):  
    pep = Peptide(peptide)  
    return pep.charge(pH=ph, pKscale="Bjellqvist")
```

Block 7: Statistische Analyse

In diesem Block werden statistische Tests durchgeführt, um Unterschiede zwischen zwei Peptid-Gruppen zu identifizieren. Dazu gehören t-Tests, die Berechnung der log2-Fold-Change und die Korrektur für multiples Testen mittels False-Discovery-Rate (FDR) nach Benjamini Hochberg. Peptide werden anschließend als „adsorbiert“ oder „nicht adsorbiert“ klassifiziert.

```

group_1_columns = [col for col in data.columns if col.startswith(group_1_prefix)]
group_2_columns = [col for col in data.columns if col.startswith(group_2_prefix)]
peptides = data["Peptides"]

p_values, log2_diffs = [], []

for peptide in peptides:
    group_1_values = data.loc[data["Peptides"]==peptide, group_1_columns].values.flatten()
    group_2_values = data.loc[data["Peptides"]==peptide, group_2_columns].values.flatten()
    t_stat, p_value = stats.ttest_ind(group_1_values, group_2_values, equal_var=False)
    log2_diff = np.mean(group_2_values) - np.mean(group_1_values)
    p_values.append(p_value)
    log2_diffs.append(log2_diff)

rejected, pvals_corrected, _, _ = multipletests(p_values, alpha=fdr_cutoff, method='fdr_bh')

results = pd.DataFrame({
    "Peptide": peptides,
    "p-value": p_values,
    "FDR-adjusted p-value": pvals_corrected,
    "log2 difference": log2_diffs
})

results["Adsorbed"] = np.where(
    (results["p-value"] < pvalue_cutoff) & (results["log2 difference"] <= fold_change_cutoff),
    "Adsorbed", "Not Adsorbed"
)

results["FDR-Adsorbed"] = np.where(
    (results["p-value"] < pvalue_cutoff) &
    (results["FDR-adjusted p-value"] < fdr_cutoff) &
    (results["log2 difference"] <= fold_change_cutoff),
    "FDR-Adsorbed", "Not FDR-Adsorbed"
)

```

Block 8: Berechnung der Peptideigenschaften

In diesem Abschnitt des Skripts werden zusätzliche Merkmale für jedes Peptid berechnet, um die Analyse über die reine Klassifikation als adsorbiert oder nicht adsorbiert hinaus zu erweitern. Zunächst wird die Länge jedes Peptids in Aminosäuren ermittelt. Anschließend wird für jedes Peptid der GRAVY-Wert (Grand Average of Hydropathy) berechnet, der Informationen über die hydrophoben oder hydrophilen Eigenschaften des Peptids liefert. Zusätzlich wird der Nettoladungszustand bei dem angegebenen pH-Wert bestimmt und in der Spalte Charge State festgehalten. Durch diese Berechnungen werden die Peptide nicht nur statistisch bewertet, sondern auch durch relevante physikochemische Eigenschaften charakterisiert, die für weiterführende Analysen oder Interpretationen der Adsorptionsverhalten herangezogen werden können.

```

results["Length"] = results["Peptide"].str.len()
results["GRAVY"] = results["Peptide"].apply(calculate_gravy_number)
results["Charge State"] = results["Peptide"].apply(calculate_charge)

```

Block 9: Speichern der Ergebnisse als Tabelle

```

fdr_label = f"Adsorbed (FDR < {fdr_cutoff})"
output_suffix = f"{group_2_prefix}_vs_{group_1_prefix}"
output_file_excel = os.path.join(directory, base_name + f"_APS-FDR_{output_suffix}" + extension)
results.rename(columns={"FDR-Adsorbed": fdr_label}, inplace=False).to_excel(output_file_excel, index=False)
print(f"Results saved to: {output_file_excel}")

```

Block 10: Visualisierung der Ergebnisse des APS-Assays

In diesem Abschnitt des Skripts werden die Ergebnisse der Peptid-Analyse graphisch dargestellt, um Muster in der Adsorption und Zusammenhänge mit physikochemischen Eigenschaften zu erkennen. Zunächst werden die Peptide anhand ihrer Klassifikation ausgewählt, sowohl für die einfache Signifikanzprüfung als auch für die FDR-korrigierte Klassifikation und die Plot-Fläche, bestehend aus 4 Abbildungen (Sub-Plos) vorbereitet.

```

adsorbed_idx = results.index[results["Adsorbed"]=="Adsorbed"]
not_adsorbed_idx = results.index[results["Adsorbed"]=="Not Adsorbed"]
fdr_adsorbed_idx = results.index[results["FDR-Adsorbed"]=="FDR-Adsorbed"]
not_fdr_adsorbed_idx = results.index[results["FDR-Adsorbed"]=="Not FDR-Adsorbed"]

plt.figure(figsize=(12,10))
plt.suptitle(f"APS-Assay Results\n{group_2_prefix} vs {group_1_prefix}", fontsize=16)

```

Volcano-Plot: Der erste Sub-Plot zeigt einen Volcano-Plot, der die \log_2 -Fold-Change der Peptid-Abundanzen zwischen den Gruppen gegen den negativen Logarithmus der p-Werte darstellt. Peptide, die als adsorbiert klassifiziert wurden, werden farblich hervorgehoben, um Signifikanz und Stärke der Veränderung auf einen Blick sichtbar zu machen.

```

plt.subplot(2,2,1)
plt.scatter(results["log2 difference"], -np.log10(results['p-value']), color='gray', alpha=0.4)
plt.scatter(results.loc[results["Adsorbed"]=="Adsorbed","log2 difference"],
           -np.log10(results.loc[results["Adsorbed"]=="Adsorbed",'p-value']),
           color='lightblue', alpha=0.7, label=f"Adsorbed ({len(adsorbed_idx)})")
plt.scatter(results.loc[results["FDR-Adsorbed"]=="FDR-Adsorbed","log2 difference"],
           -np.log10(results.loc[results["FDR-Adsorbed"]=="FDR-Adsorbed",'p-value']),
           color='darkblue', alpha=0.9, label= f"Adsorbed (FDR < {fdr_cutoff}) ({len(fdr_adsorbed_idx)})")
plt.axhline(-np.log10(0.05), color='black', linestyle='--', linewidth=1)
plt.axvline(-1, color='black', linestyle='--', linewidth=1)
plt.axvline(1, color='black', linestyle='--', linewidth=1)
plt.title("Volcano Plot")
plt.xlabel("log2 difference")
plt.ylabel("-log10(p-value)")

```

GRAVY-Violin-Plot: Im zweiten Sub-Plot werden die hydrophoben Eigenschaften der Peptide, dargestellt durch den GRAVY-Wert, visualisiert. Die Verteilung der GRAVY-Werte wird getrennt für „nicht adsorbierte“ und „adsorbierte“ Peptide angezeigt. Zusätzlich werden die Mediane eingeblendet und ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, um statistische Unterschiede zu prüfen.

```

plt.subplot(2, 2, 2)
sns.violinplot(
    data=[results.loc[not_fdr_adsorbed_idx, 'GRAVY'],
          results.loc[fdr_adsorbed_idx, 'GRAVY']],
    palette=['gray','darkblue']
)
plt.title("GRAVY Numbers")
plt.ylabel("GRAVY")
plt.xticks([0, 1], ['Not Adsorbed', f'Adsorbed (FDR < {fdr_cutoff})'])
plt.ylim(-4, 4)

median_not_adsorbed = np.median(results.loc[not_fdr_adsorbed_idx, 'GRAVY'])
plt.text(0, -4.6, f"Median: {median_not_adsorbed:.2f}", ha='center', va='top', color='black')

if len(fdr_adsorbed_idx) > 0:
    median_adsorbed = np.median(results.loc[fdr_adsorbed_idx, 'GRAVY'])
    plt.text(1, -4.6, f"Median: {median_adsorbed:.2f}", ha='center', va='top', color='black')

    from scipy.stats import mannwhitneyu
    gravy_not_adsorbed = results.loc[not_fdr_adsorbed_idx, 'GRAVY']
    gravy_adsorbed = results.loc[fdr_adsorbed_idx, 'GRAVY']

    u_stat, p_val = mannwhitneyu(gravy_not_adsorbed, gravy_adsorbed, alternative='two-sided',
                                   use_continuity=True)
    plt.text(0.5, 3.8, f'Mann-Whitney p = {p_val:.3e}', ha='center', va='top', color='black')

else:
    plt.text(1, -4.6, "Median: n.a.", ha='center', va='top', color='black')
    plt.text(0.5, 3.8, "Mann-Whitney p = n.a.", ha='center', va='top', color='black')

```

Peptid-Längen-Plot: Der dritte Sub-Plot zeigt die Häufigkeitsverteilung der Peptidlängen für adsorbierte und nicht adsorbierte Peptide. Die Werte werden prozentual normalisiert, sodass der relative Anteil der Peptide jeder Länge sichtbar wird.

```

lengths = sorted(results["Length"].unique())
ads_len = results.loc[fdr_adsorbed_idx,'Length'].value_counts().reindex(lengths, fill_value=0)
not_ads_len = results.loc[not_fdr_adsorbed_idx,'Length'].value_counts().reindex(lengths,
                                fill_value=0)
plt.subplot(2,2,3)
plt.bar(np.arange(len(lengths)), ads_len/ads_len.sum()*100, color='darkblue', label=f'Adsorbed (FDR < {fdr_cutoff})')
plt.bar(np.arange(len(lengths))+0.3, not_ads_len/not_ads_len.sum()*100, color='gray', alpha=0.7,
        label='Not Adsorbed')
plt.title("Peptide Length Occurrence")
plt.xlabel("Peptide Length")
plt.ylabel("Percentage of Peptides")
plt.xticks(np.arange(len(lengths)), lengths, fontsize=8)
plt.legend()

```

Ladungszustands-Plot: Im vierten Sub-Plot wird die Verteilung der Peptid-Ladungszustände angezeigt. Adsorbierte und nicht adsorbierte Peptide werden farblich unterschieden, ebenfalls prozentual normiert.

```
# Runde Ladungszustände für vereinfachte Interpretation
results["Rounded Charge"] = results["Charge State"].round().astype(int)

charge_states = sorted(results["Rounded Charge"].dropna().unique())
ads_charge = results.loc[fdr_adsorbed_idx,'Rounded
Charge'].value_counts().reindex(charge_states, fill_value=0)
not_ads_charge = results.loc[not_fdr_adsorbed_idx,'Rounded
Charge'].value_counts().reindex(charge_states, fill_value=0)

plt.subplot(2,2,4)
bar_width = 0.4
x = np.array(charge_states)
plt.bar(x+bar_width/2, ads_charge/ads_charge.sum()*100, width=bar_width, color='darkblue',
label=f'Adsorbed (FDR < {fdr_cutoff})')
plt.bar(x-bar_width/2, not_ads_charge/not_ads_charge.sum()*100, width=bar_width, color='gray',
alpha=0.7, label='Not Adsorbed')
plt.title("Peptide Charge State Occurrence")
plt.xlabel("Charge State [H+]")
plt.ylabel("Percentage of Peptides")
plt.xticks(charge_states)
plt.legend([f'Adsorbed (FDR < {fdr_cutoff})', 'Not Adsorbed'])
```

Abschließend wird das Layout optimiert, sodass alle Plots sauber angeordnet sind, und die gesamte Abbildung wird als PDF-Datei gespeichert.

```
plt.tight_layout()
plt.subplots_adjust(top=0.9)

output_file_pdf = os.path.join(directory, base_name + f"_APS-FDR_{output_suffix}.pdf")
plt.savefig(output_file_pdf, format='pdf')
print(f"Plot saved as {output_file_pdf}")
```

10.3. Ergänzende Abbildungen

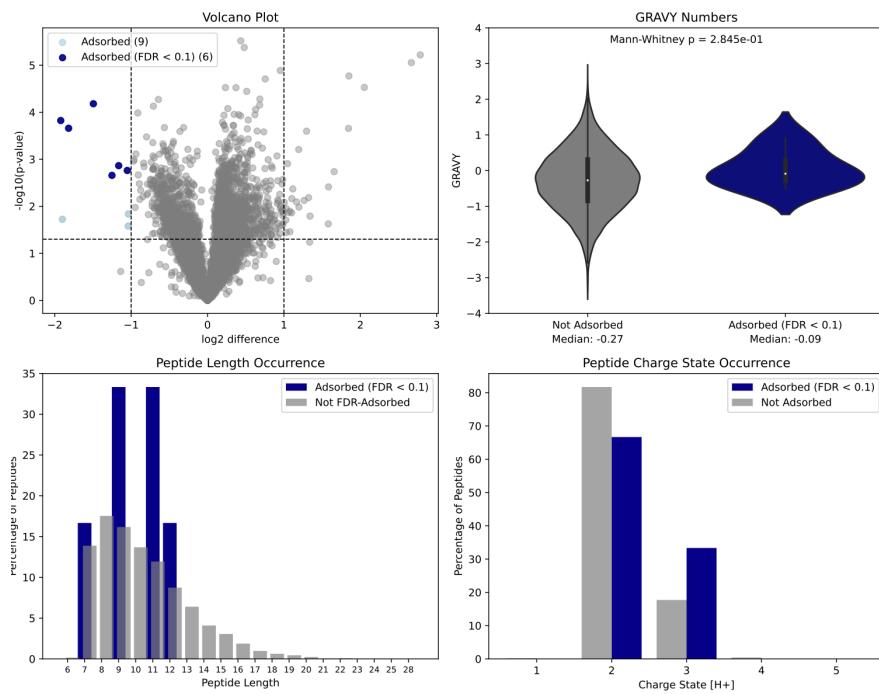


Abbildung A1: APS-Assay-Ergebnisse der 96-Well-m-PP-Platte von Hersteller A. Basierend auf 7.903 Peptiden ($n=4$). Oben links: Volcano-Plot basierend auf den Ergebnissen des Welch's t-Tests. Signifikant adsorbierte Peptide sind hellblau (p -Wert $< 0,05$ und \log_2 -Fold-Change ≤ -1) oder dunkelblau (zusätzlich FDR-signifikant, q -Wert $< 0,1$). Oben rechts: Violin-Plots der GRAVY-Werte von adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden mit Mann-Whitney-U p -Wert. Unten links: Anteil vorhandener Peptidlängen bei adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden in Prozent. Unten rechts: Anteil der jeweiligen Peptidladungen bei adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden in Prozent.

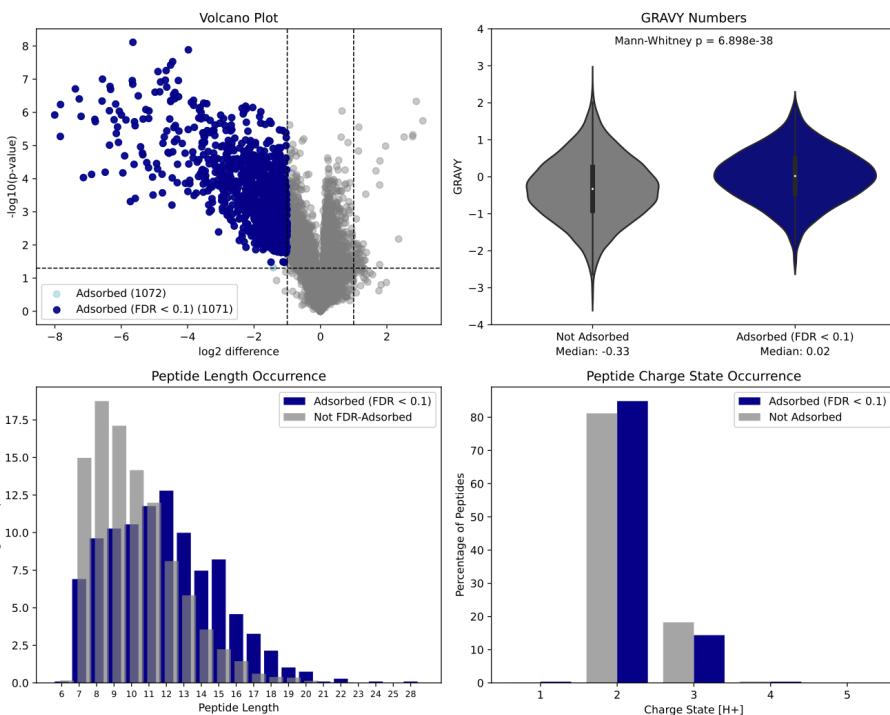


Abbildung A2: APS-Assay-Ergebnisse der 96-Well-PP-Platte von Hersteller A. Basierend auf 7.903 Peptiden ($n=4$). Oben links: Volcano-Plot basierend auf den Ergebnissen des Welch's t-Tests. Signifikant adsorbierte Peptide sind hellblau (p -Wert $< 0,05$ und \log_2 -Fold-Change ≤ -1) oder dunkelblau (zusätzlich FDR-signifikant, q -Wert $< 0,1$). Oben rechts: Violin-Plots der GRAVY-Werte von adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden mit Mann-Whitney-U p -Wert. Unten links: Anteil vorhandener Peptidlängen bei adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden in Prozent. Unten rechts: Anteil der jeweiligen Peptidladungen bei adsorbierten und nicht-adsorbierten Peptiden in Prozent.

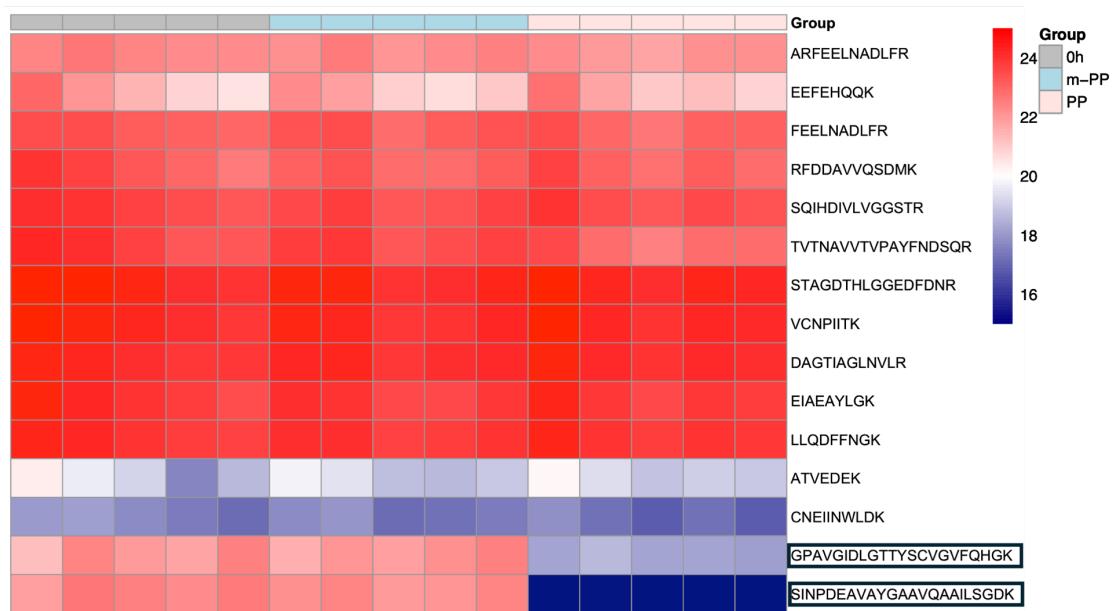


Abbildung A3: Abundanzverteilung der quantifizierten Peptide des Proteins HSPA8 (Protein Heat shock cognate 71 kDa protein). Das Protein ist nicht signifikant in seiner Abundanz verändert (p -Wert: 0.33986, \log_2 -Fold-Change: -0.232818), da es neben den zwei stark adsorbierten Peptiden (schwarzer Kasten) viele nicht-adsorbierte Peptide gibt.

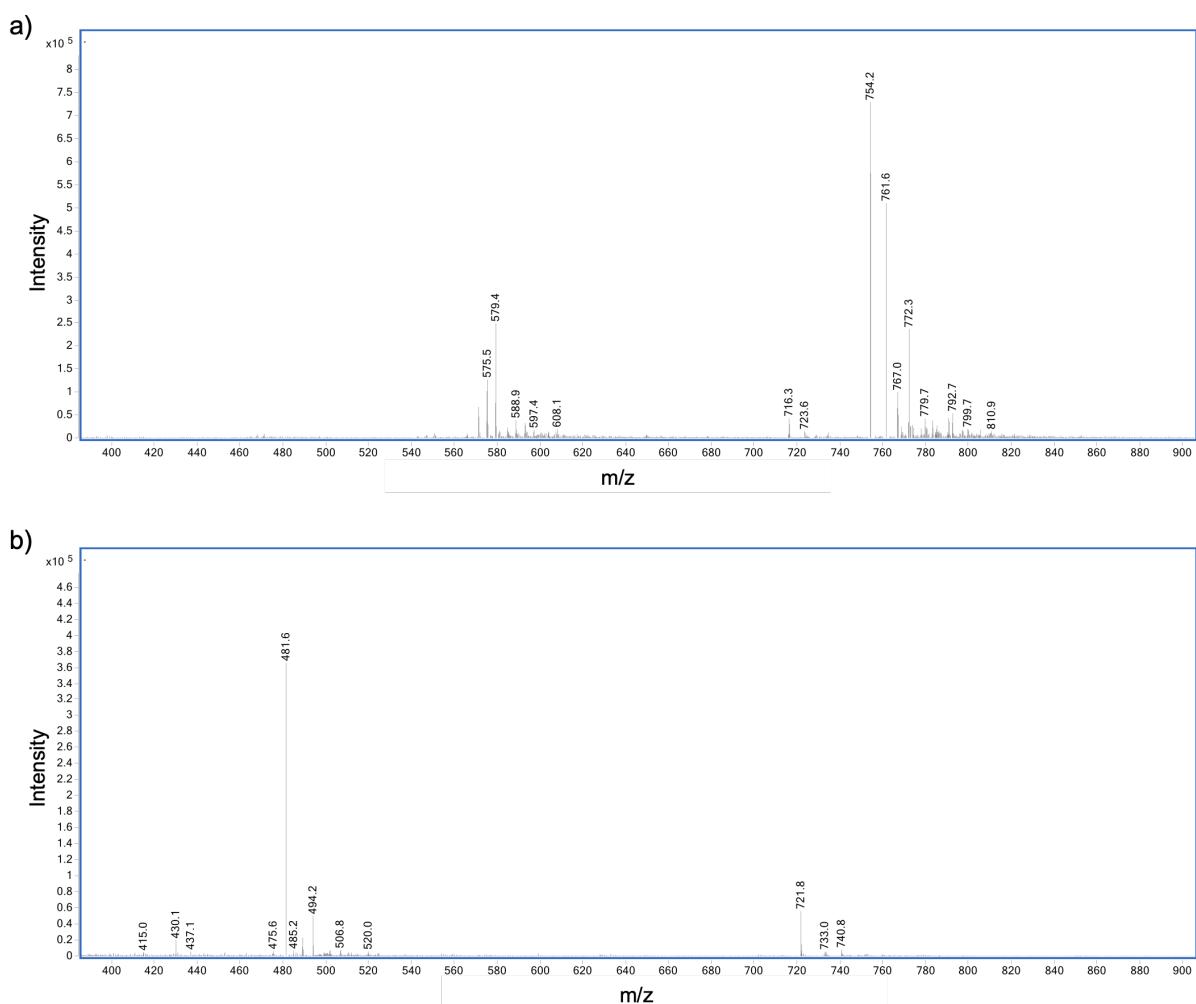


Abbildung A4: MS1-Spektren der ausgewählten Peptide nach Messung auf dem Tandem-Quadrupol-MS. a) Hydrophobes Peptid SINPDEAVYYGAAVQAAILSGDK, überwiegend dreifach protoniert ($m/z = 754.2$, $z = 3$),

Massen 2259,58 Da. b) Hydrophiles Peptid DGETPDPEDPSRK, überwiegend dreifach protoniert ($m/z = 481,6$, $z = 3$), Masse 1441,78 Da.

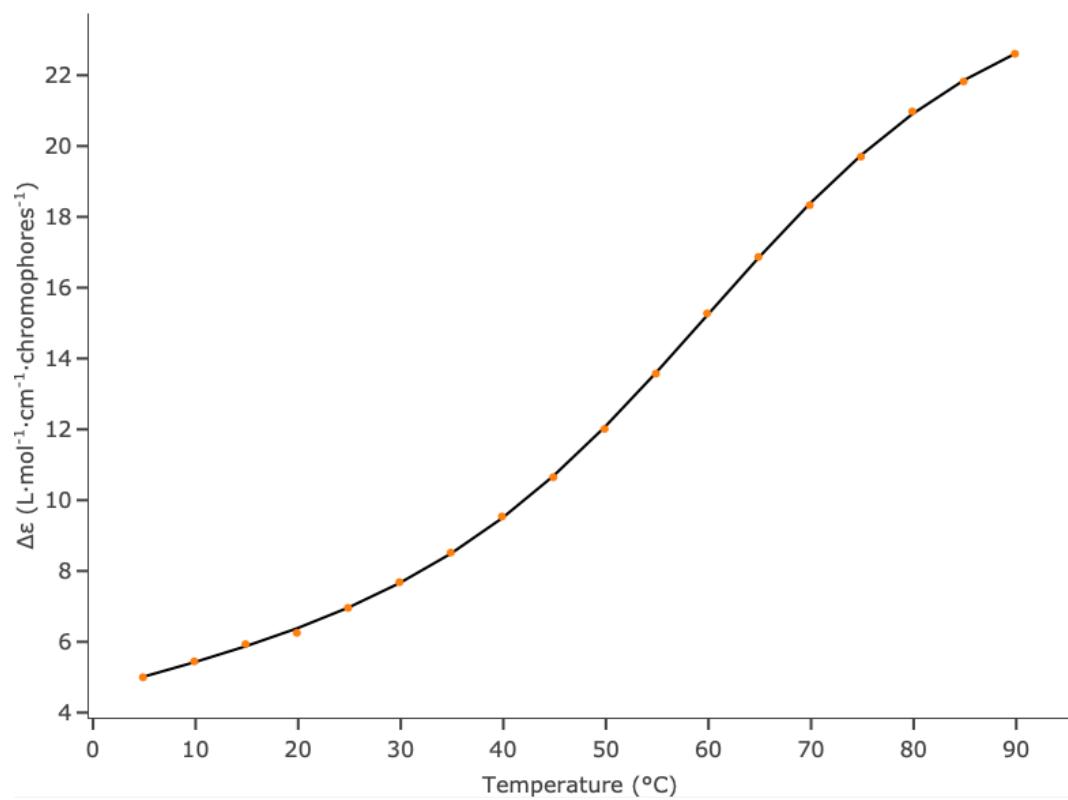


Abbildung A5: Schmelzkurve des hydrophoben Peptids in Wasser von 5-95 °C. Gemessen über Zirkulardichrosismus-Spektrtoskopie mit Bestimmung bei 183 nm. Die Auswertung und Ermittlung der T_m erfolgte in ChiraKit.

10.4. Ergänzende Tabellen

Tabelle A1: APS-Assay-Ergebnisse der adsorbierten Peptide an PP-Gefäße von Hersteller A.

Peptidsequenz	p-Wert	log ₂ -Fold-Change	Status	GRAVY-Wert	Länge (Anzahl Aminosäuren)	Ladung (+)
MAAGVEAAAEEVAATEIK	0,0008	-1,1146	adsorbiert	0,7000	17	2
MAETLEFNDVYQEVK	0,0011	-1,1370	adsorbiert	-0,5467	15	2
MAEVQVLVLDGR	0,0000	-1,3547	adsorbiert	0,7083	12	2
MDDDIAALVVVDNGSGMCK	0,0384	-1,3569	adsorbiert	0,2000	18	2
MSGEDEEQQEQTIAEDLVVTK	0,0006	-1,2139	adsorbiert	-0,8800	20	2
AFLADPSAFVAAAPVAAATTAAAPAAAAAPAK	0,0001	-2,0524	adsorbiert	1,0452	31	2
APNTPDILEIEFK	0,0436	-1,0212	adsorbiert	-0,3385	13	2
ASASGSGAQVGGPISSGSSASSVTVR	0,0001	-1,0276	adsorbiert	0,1519	27	2
ASGPGLNNTGVPASLPVEFTIDAK	0,0005	-1,6338	adsorbiert	0,1917	24	2
DAAIYLVTSASK	0,0002	-2,4465	adsorbiert	0,8231	13	2
DASDDLDLNNFFNQK	0,0101	-1,2440	adsorbiert	-1,1800	15	2
DIINEEEVQFLK	0,0016	-1,5254	adsorbiert	-0,4250	12	2
DILPCLDGYLK	0,0054	-1,5056	adsorbiert	0,3818	11	2
DLTDGHFENILADNSVNDQTK	0,0031	-2,8842	adsorbiert	-0,9667	21	3
DNHLLGTFDLTGIPPAAPR	0,0140	-1,2840	adsorbiert	-0,2611	18	3
DPVQEAWAEDVDLR	0,0052	-3,0416	adsorbiert	-0,8714	14	2
DSVVAGFQWATK	0,0001	-2,5991	adsorbiert	0,0917	12	2
DTVATQLSEAVDATR	0,0225	-1,0473	adsorbiert	-0,2533	15	2
EAHQLFLEPEVLDPESVELK	0,0006	-1,9164	adsorbiert	-0,3700	20	3
EFNEDGALAVLQQFK	0,0004	-2,6260	adsorbiert	-0,2867	15	2
EGPYDVVVLPGGNLGAQNLSESAAVK	0,0001	-1,0147	adsorbiert	0,0385	26	2
EILVGDVGQTVDPPYATFVK	0,0001	-3,0017	adsorbiert	0,1600	20	2
ELAPYDENWFYTR	0,0167	-1,0762	adsorbiert	-1,2231	13	2
FGYVDFESAEDLEK	0,0001	-1,5372	adsorbiert	-0,6071	14	2
FLDGNELTACCNLLPK	0,0010	-1,5437	adsorbiert	0,1176	17	2
FNEEHIPDSPFVVPVAPSGDAR	0,0025	-1,1100	adsorbiert	-0,3522	23	3
GADFLVTEVENGGSLGSK	0,0052	-1,1286	adsorbiert	-0,0667	18	2
GDVAEGDLIEHFSQFGTVEK	0,0006	-1,4473	adsorbiert	-0,3350	20	3
GFGFVDFNSEEADAK	0,0001	-1,1062	adsorbiert	-0,6143	14	2
GLAPDLPEDLYHLIK	0,0023	-1,1084	adsorbiert	-0,0667	15	3
GLVEPVVDVNADGTQTVNYVPSR	0,0004	-1,3069	adsorbiert	-0,2375	24	2
GVVPLAGTNGETTQGLDGLSER	0,0282	-1,0028	adsorbiert	-0,3304	23	2
IALGIPLPEIK	0,0109	-1,0135	adsorbiert	1,0818	11	2
IAPSFAVESIEDALK	0,0002	-3,0337	adsorbiert	0,5067	15	2
ICDQISDAVLAHLQQDPDAK	0,0109	-1,0884	adsorbiert	-0,4191	21	3
IEWLESHQDADIEDFK	0,0003	-1,3887	adsorbiert	-0,9938	16	3
IHSDQELQSANASVDDSR	0,0045	-1,8157	adsorbiert	-0,7947	19	3
IPVDTYNNILTVALK	0,0023	-1,0094	adsorbiert	0,4500	14	2
ISSIQSIVPALEIANAHR	0,0028	-1,0509	adsorbiert	0,5111	18	3
ITPENLPQILLQLK	0,0036	-1,0158	adsorbiert	0,1714	14	2
IYVDDGLISLQVK	0,0002	-1,0696	adsorbiert	0,6231	13	2
LAAAVSNFGYDLYR	0,0079	-1,2163	adsorbiert	0,3357	14	2
LASVPAGGAVAVSAAPGSAAPAAGSAPAAAEEK	0,0006	-1,5705	adsorbiert	0,5909	33	2
LFIGGLSFETTDLSLR	0,0001	-1,1358	adsorbiert	0,1688	16	2
LLPQLTYLDGYDRDDK	0,0218	-1,0595	adsorbiert	-1,0000	16	3
LVINGNPITIFQER	0,0070	-1,2179	adsorbiert	0,2214	14	2
LYLTVTYVPVTTFK	0,0003	-1,1687	adsorbiert	0,8643	14	2
NAGNCLSPAVIVGLLK	0,0007	-2,0932	adsorbiert	1,0188	16	2
NILEESLCELVALK	0,0054	-1,6781	adsorbiert	0,4385	13	2
NNQFQALLQYADPVSAQHAK	0,0022	-1,2228	adsorbiert	-0,6750	20	3
NVGLDIEAEVPAVK	0,0000	-1,0400	adsorbiert	0,3286	14	2
QTIDNSQGAYQEAFDISK	0,0120	-2,0745	adsorbiert	-0,9444	18	2
SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK	0,0000	-3,2527	adsorbiert	0,2304	23	2
SLDFNCEVTNLNDYR	0,0005	-1,6193	adsorbiert	-0,4625	16	2
SLNLSTEFISSTK	0,0020	-1,6103	adsorbiert	-0,0462	13	2
SLVASLAEPDFVVTDFAK	0,0007	-2,0123	adsorbiert	0,7167	18	2
SQVFSTAADGQTQVEIK	0,0001	-1,2932	adsorbiert	-0,3235	17	2
SSGEIVYCGQVFEK	0,0012	-1,3614	adsorbiert	0,0071	14	2
TGLIDYNQLALTAR	0,0012	-1,0295	adsorbiert	0,1000	14	2
TIAECLADELINAAK	0,0026	-1,0750	adsorbiert	0,5133	15	2
TITLEVEPSDTIENVK	0,0012	-1,0608	adsorbiert	-0,2938	16	2
TLAQLNPESSLFIASK	0,0031	-1,0942	adsorbiert	0,4529	17	2
TVAGQDAVIVLLGTR	0,0031	-1,1065	adsorbiert	0,9733	15	2
TVLGTPEVLLGALPGAGGTQR	0,0017	-1,2703	adsorbiert	0,4000	21	2

TVYFAEEVQCEGNSFK	0,0003	-1,3943	adsorbiert	-0,5588	17	3
VEEQEPELTSTPNFVVEVIK	0,0002	-1,6560	adsorbiert	-0,2950	20	2
VHSPSGALEECYVTEIDQDK	0,0014	-1,8928	adsorbiert	-0,6350	20	3
VLAGETLSVNDPPDVLDR	0,0000	-1,6318	adsorbiert	-0,0722	18	2
VLDNYLTSPLEEVDETSAEDEGVSQR	0,0001	-2,2194	adsorbiert	-0,8296	27	2
VPADTEVVCAPPTAYIDFAR	0,0008	-1,3522	adsorbiert	0,3550	20	2
VSGLLVLDYSK	0,0107	-1,1165	adsorbiert	0,8273	11	2
VVVQVLAEEPEAVLK	0,0001	-1,1060	adsorbiert	0,8467	15	2
YTPSGQAGAAASESLFVSNHAY	0,0000	-1,5189	adsorbiert	-0,1273	22	2
YTVQDESHSEWVSCVR	0,0181	-1,2875	adsorbiert	-0,7438	16	3
AAVATFLQSVQVPEFTP	0,0003	-1,9625	adsorbiert	0,4222	18	2
AEDNADTALVFEAPNQE	0,0004	-1,1528	adsorbiert	-0,6526	19	2
DADVQNFVFSFISK	0,0016	-1,1549	adsorbiert	0,0615	13	2
DAGYGGISLAVEGPSK	0,0038	-1,4085	adsorbiert	-0,0563	16	2
DIISIAEDEDLR	0,0001	-1,7413	adsorbiert	-0,3083	12	2
DISEASVFDAYVLPK	0,0003	-1,8093	adsorbiert	0,2800	15	2
DLYEDELVPLFEK	0,0062	-1,1118	adsorbiert	-0,4539	13	2
DYLHLPPEIVPATLR	0,0177	-1,0701	adsorbiert	0,0267	15	3
EGPYSISVLYGDEEVPR	0,0066	-1,0206	adsorbiert	-0,5882	17	2
ELLNPVVEFVSHPSTTCR	0,0089	-1,2110	adsorbiert	0,0611	18	3
EVSFQSTGESEWK	0,0004	-1,2750	adsorbiert	-1,1769	13	2
FDQLFDDESDFPFEVLK	0,0001	-2,8957	adsorbiert	-0,6625	16	2
FGFPEGSVELYAEK	0,0001	-1,2096	adsorbiert	-0,2500	14	2
FTP GTFTNQIQA	0,0007	-1,3090	adsorbiert	-0,1733	15	2
FYALSASFEPFSNK	0,0008	-1,0075	adsorbiert	-0,0286	14	2
IDFYFDENPYFENK	0,0008	-1,3287	adsorbiert	-1,1571	14	2
IIDVVYNASNNELVR	0,0002	-1,4119	adsorbiert	0,2067	15	2
ITITGTQDQIQNAQYLLQNSVK	0,0000	-2,1406	adsorbiert	-0,2130	23	2
ISLGLPVGAVINCADNTGAK	0,0008	-1,3628	adsorbiert	0,7100	20	2
IYGLGSLALYEK	0,0006	-1,1247	adsorbiert	0,5083	12	2
LAPITSDPTEATAVGAVEASFK	0,0001	-1,9585	adsorbiert	0,3091	22	2
LDLLTADSPQPVFK	0,0004	-1,0275	adsorbiert	-0,1600	15	2
LFVGNLPADITEDEFK	0,0005	-2,0097	adsorbiert	-0,0250	16	2
LGGLTQAPGNPVLAVQINQDK	0,0013	-1,6099	adsorbiert	-0,1000	21	2
LLTSFLPAQLLR	0,0058	-1,1928	adsorbiert	1,0417	12	2
LQLETEIEALK	0,0048	-1,7201	adsorbiert	-0,0818	11	2
LVGQGASAVLLDPNSGGEAQAK	0,0003	-1,7851	adsorbiert	0,2000	23	2
LVSPGSANETSSILVESVTR	0,0108	-2,1614	adsorbiert	0,2050	20	2
LYGPSSVSFADDFVR	0,0013	-1,1388	adsorbiert	0,1600	15	2
NEEDAAELVALAQAVNAR	0,0007	-1,9613	adsorbiert	-0,1222	18	2
QSGEAFVELGSEDDVK	0,0009	-1,3671	adsorbiert	-0,6563	16	2
SAGQQGEVLYYVEDPAGHQEEAK	0,0003	-1,1763	adsorbiert	-0,6682	22	3
SVDVILDDDLVDK	0,0003	-1,0142	adsorbiert	0,1923	13	2
TSRPENAIYNNNEDFQVGQAK	0,0019	-1,4260	adsorbiert	-1,1409	22	3
TYQELLVNQNPIAQPLASR	0,0242	-1,3953	adsorbiert	-0,4105	19	2
VDVAVNCAGIAVASK	0,0009	-1,0814	adsorbiert	1,2600	15	2
VTYCPTEPGNYIINIK	0,0152	-1,5031	adsorbiert	-0,1125	16	2
YLYTLVITDK	0,0070	-1,1540	adsorbiert	0,4900	10	2

Tabelle A2: APS-Assay-Ergebnisse der adsorbierten Peptide an PP-Gefäße von Hersteller B.

Peptidsequenz	p-Wert	log ₂ -Fold-Change	Status	GRAVY-Wert	Länge (Anzahl Aminosäuren)	Ladung (+)
MAAGVEAAAEEVAATEIK	0,0157	-1,3241	adsorbiert	0,7000	17	2
MAEVQVLVLDGR	0,0141	-1,0411	adsorbiert	0,7083	12	2
MSGEDEQEQEQTIAEDLVT	0,0003	-1,5497	adsorbiert	-0,8800	20	2
AAGVNVEFWPGLFAK	0,0428	-1,3307	adsorbiert	0,4625	16	2
AALSALESFLK	0,0207	-1,0587	adsorbiert	0,9636	11	2
APVPTGEVYFADSFDR	0,0008	-1,7932	adsorbiert	-0,2375	16	2
ASGPGLNTTGPASLPVEFTIDAK	0,0319	-2,2110	adsorbiert	0,1917	24	2
DAAIYLVTSLASK	0,0029	-1,6840	adsorbiert	0,8231	13	2
DSVVAGFQWATK	0,0017	-1,1450	adsorbiert	0,0917	12	2
EFNEDGALAVLQQFK	0,0227	-2,2276	adsorbiert	-0,2867	15	2
EGPYDVVVLPGGNLGAQNLSEAAVK	0,0459	-1,4020	adsorbiert	0,0385	26	2
EILVGDVGQTVDDPYATFVK	0,0169	-1,3273	adsorbiert	0,1600	20	2
EQGYDVIAYLANIGQK	0,0169	-2,1416	adsorbiert	-0,2625	16	2
FASYLTFSPEVK	0,0001	-1,0900	adsorbiert	0,1538	13	2
FGYVDFESAEDLEK	0,0014	-1,9110	adsorbiert	-0,6071	14	2
FLDGNELTLADCNLLPK	0,0028	-2,2756	adsorbiert	0,1176	17	2
GAGTNEDALIEILTTR	0,0278	-1,8556	adsorbiert	-0,0750	16	2
GDVAEGDLIEHFSQFGTVEK	0,0162	-1,4002	adsorbiert	-0,3350	20	3

GIVDQSQQAYQEAFFEISK	0,0173	-1,1352	adsorbiert	-0,6722	18	2
GLAPDLPEDLYHLIK	0,0060	-2,8453	adsorbiert	-0,0667	15	3
GQYISPFHDPIYADK	0,0089	-1,0461	adsorbiert	-0,4063	16	3
GVDEATIIDILTK	0,0172	-1,6504	adsorbiert	0,5462	13	2
IAPSFAVESIEDALK	0,0382	-1,8389	adsorbiert	0,5067	15	2
IEWLESHQDADIEDFK	0,0212	-1,1580	adsorbiert	-0,9938	16	3
IGPILDNSTLQSEVKPILEK	0,0125	-1,9637	adsorbiert	-0,1050	20	3
IYVDDGLISLQVK	0,0463	-3,0568	adsorbiert	0,6231	13	2
LAATNALLNSLEFTK	0,0147	-1,3706	adsorbiert	0,4533	15	2
LAGANPAVITCDELLLGHEK	0,0140	-1,1465	adsorbiert	0,3800	20	3
LASDLLEWIR	0,0392	-1,3470	adsorbiert	0,4500	10	2
LDNLVAILDINR	0,0048	-2,2206	adsorbiert	0,6583	12	2
LFIGGLSFETTDESLR	0,0028	-2,7871	adsorbiert	0,1688	16	2
LGGSAVISLEGKPL	0,0020	-1,1539	adsorbiert	0,7214	14	2
LICCDIILDVLDK	0,0244	-1,6682	adsorbiert	1,2667	12	2
LISWYDNEFGYSNR	0,0084	-1,0848	adsorbiert	-0,9214	14	2
LLPQLTYLDGYDRDDK	0,0112	-1,0026	adsorbiert	-1,0000	16	3
LYTLVTYVPVTTFK	0,0259	-1,4259	adsorbiert	0,8643	14	2
NAGNCLSPAIVGLLK	0,0383	-1,2848	adsorbiert	1,0188	16	2
NILEESLCELVAK	0,0175	-1,5490	adsorbiert	0,4385	13	2
NVGLDIEAEVPAVK	0,0051	-1,5033	adsorbiert	0,3286	14	2
SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK	0,0050	-4,2899	adsorbiert	0,2304	23	2
SLDLFNCEVTNLNDYR	0,0120	-2,6618	adsorbiert	-0,4625	16	2
SLVASLAEPDFVVTDFAK	0,0140	-2,5460	adsorbiert	0,7167	18	2
TGLIDYNQALATAR	0,0017	-1,2122	adsorbiert	0,1000	14	2
TIAECLADELINAAK	0,0119	-2,6325	adsorbiert	0,5133	15	2
TVLGTPEVLLGALPGAGGTQR	0,0486	-1,1529	adsorbiert	0,4000	21	2
VDINAPDVQGPDWHLK	0,0115	-1,4224	adsorbiert	-0,5500	18	3
VLDNYLTSPLEEVDETAEDEGVSQR	0,0102	-2,2078	adsorbiert	-0,8296	27	2
VTEGLVDVILYHQPDDK	0,0178	-1,3204	adsorbiert	-0,2294	17	3
YAALYQPLFDK	0,0001	-1,0131	adsorbiert	-0,1000	11	2
YTPSGQQAGAAASESLFVSNHAY	0,0038	-1,8552	adsorbiert	-0,1273	22	2
AAVATFLQSVQVPEFTP	0,0226	-1,8709	adsorbiert	0,4222	18	2
AAVEEGIVLGGGCALLR	0,0039	-1,8449	adsorbiert	1,1235	17	2
ATIAGIPQSIIECVK	0,0292	-2,5771	adsorbiert	1,1500	16	2
ALHSVLQAVPLNELR	0,0279	-1,6071	adsorbiert	0,4400	15	3
ALPFWNEEIVPQIK	0,0294	-1,5625	adsorbiert	-0,0286	14	2
AQTEGINISEEALNHLGEIGTK	0,0403	-1,1421	adsorbiert	-0,4682	22	3
ATENDIANFFSPLNPIR	0,0306	-1,5015	adsorbiert	-0,2765	17	2
DALSDLALHFLNK	0,0189	-1,6226	adsorbiert	0,2462	13	3
DICNDVLSLLEK	0,0135	-3,5150	adsorbiert	0,3250	12	2
DISEASVFDAYVLPK	0,0060	-2,4606	adsorbiert	0,2800	15	2
DYLHLPPEIVPATLR	0,0399	-1,2698	adsorbiert	0,0267	15	3
EGRPSGEAFVELESEDEVK	0,0014	-1,3403	adsorbiert	-1,0579	19	3
EYFSWEGAQFHVGK	0,0028	-2,0490	adsorbiert	-0,7000	14	3
FDQLFDDESDPFEVULK	0,0089	-2,0626	adsorbiert	-0,6625	16	2
FGFPEGSVELYAEK	0,0007	-1,6952	adsorbiert	-0,2500	14	2
GITGVDLFGTTDAVVK	0,0026	-1,2155	adsorbiert	0,7063	16	2
GQCDLELINVCNENSLFK	0,0275	-1,3420	adsorbiert	-0,0944	18	2
GSYGDLLGGPIITQTQVTIPK	0,0020	-1,0457	adsorbiert	0,0842	19	2
GTIEILSDVQLIK	0,0111	-2,9033	adsorbiert	0,6923	13	2
IDFYFDENPYFENK	0,0216	-1,8672	adsorbiert	-1,1571	14	2
IGGVQQDTILAEGLHFR	0,0099	-1,6133	adsorbiert	0,1059	17	3
ITITGTQDQIQNAQYLLQNSVK	0,0048	-3,5792	adsorbiert	-0,2130	23	2
ILLWDTR	0,0073	-1,3982	adsorbiert	0,3571	7	2
ISGETIFVTAPHEATAGIIVGVR	0,0153	-1,3228	adsorbiert	0,4652	23	3
LAPITSDPTEATAVGAVEASFK	0,0212	-1,9758	adsorbiert	0,3091	22	2
LDLLTADSQPPVFK	0,0411	-1,3551	adsorbiert	-0,1600	15	2
LLIHQSLSLAGGIIGVK	0,0017	-2,1354	adsorbiert	1,2200	15	3
LLTSFLPAQLLR	0,0229	-1,6039	adsorbiert	1,0417	12	2
LQLETEIEALK	0,0010	-2,2562	adsorbiert	-0,0818	11	2
LVLEVAQHLAGESTVR	0,0008	-1,3037	adsorbiert	0,3800	15	3
STGEAFVQFASQEIAEK	0,0032	-1,4390	adsorbiert	-0,2588	17	2
TFCQLILDPIFK	0,0134	-1,9941	adsorbiert	0,9583	12	2
TFSVWYVPEVTGTHK	0,0121	-1,1295	adsorbiert	-0,1533	15	3
TGDFQLHTNVNDGTEFGGSIYQK	0,0027	-2,0644	adsorbiert	-0,8391	23	3
VALTGLTVAEYFR	0,0069	-1,2704	adsorbiert	0,8692	13	2
VGWEQLLTTIAR	0,0293	-2,3278	adsorbiert	0,3250	12	2
VQVALEELQDLK	0,0003	-1,0495	adsorbiert	0,0167	12	2
ATENDIYNFFSPLNPVR	0,0175	-1,9533	adsorbiert	-0,4765	17	2

Tabelle A3: APS-Assay-Ergebnisse der adsorbierten Peptide an PP-Gefäße von Hersteller C.

Peptidsequenz	p-Wert	log ₂ -Fold-Change	Status	GRAVY-Wert	Länge (Anzahl Aminosäuren)	Ladung (+)
MAAGVEAAAEEVAATEIK	0,0020	-1,7715	adsorbiert	0,7000	17	2
MADKPDMGEIASFDK	0,0247	-1,0691	adsorbiert	-0,6600	15	3
MAEVQVLVLDGR	0,0019	-1,9444	adsorbiert	0,7083	12	2
MDDDIAALVVVDNGSGMCK	0,0352	-1,1753	adsorbiert	0,2000	18	2
MSDKPDMAEIEK	0,0353	-1,2489	adsorbiert	-1,1750	12	3
MSGEDEQQEQTIAEDLVVTK	0,0020	-1,3569	adsorbiert	-0,8800	20	2
AAGVNVEPFWPGLFAK	0,0040	-1,7087	adsorbiert	0,4625	16	2
ADVIQATGDAICIFR	0,0321	-1,0174	adsorbiert	0,8200	15	2
AFLADPSAFVAAAPVAAATTAAAPAAAAAPAK	0,0179	-1,4324	adsorbiert	1,0452	31	2
AIIIFVPVPQLK	0,0175	-1,4314	adsorbiert	1,6417	12	2
APVPTGEVFYFADSFDR	0,0006	-2,1707	adsorbiert	-0,2375	16	2
ASGPGLNTTGVGPASLPVEFTIDAK	0,0006	-3,5955	adsorbiert	0,1917	24	2
CQLEINFNTLQTK	0,0149	-1,0386	adsorbiert	-0,4154	13	2
DAAIYLVTSASK	0,0000	-2,9654	adsorbiert	0,8231	13	2
DFLAGGIAAAISK	0,0015	-1,2568	adsorbiert	1,0615	13	2
DNHLLGTFDLTGIPPAPR	0,0254	-1,4379	adsorbiert	-0,2611	18	3
EAHQLFLEPEVLDPEVELK	0,0097	-1,1906	adsorbiert	-0,3700	20	3
EFNEDGALAVLQQFK	0,0013	-1,9785	adsorbiert	-0,2867	15	2
EGPYDVVVLPGGNLGAQNLSESAAVK	0,0050	-2,5604	adsorbiert	0,0385	26	2
EILVGDVQGQTVDDPYATFVK	0,0107	-1,7827	adsorbiert	0,1600	20	2
EQGYDVIAYLANIQKQ	0,0085	-1,4630	adsorbiert	-0,2625	16	2
FGYVDFESAEDLEK	0,0008	-2,0325	adsorbiert	-0,6071	14	2
FLDGNELTACCNLLPK	0,0101	-1,4367	adsorbiert	0,1176	17	2
FTITPPATAQVVGVLK	0,0244	-1,0787	adsorbiert	0,8267	15	2
GAGTNEDALIEIILTR	0,0009	-1,7563	adsorbiert	-0,0750	16	2
GDVAEGDLIEHFSQFGTVEK	0,0144	-1,1018	adsorbiert	-0,3350	20	3
GIRPAINVGLSVER	0,0013	-1,5256	adsorbiert	0,4643	14	3
GIVDQSQQAYQEAFEISK	0,0131	-1,3504	adsorbiert	-0,6722	18	2
GLAPDLPEDLYHLIK	0,0001	-2,9196	adsorbiert	-0,0667	15	3
GLVEPVDVVDNADGTQTVNYVPSR	0,0097	-1,2341	adsorbiert	-0,2375	24	2
GVDEATIIDILTK	0,0010	-2,0962	adsorbiert	0,5462	13	2
GVTIASGGVLPNIHPELLAK	0,0035	-1,7891	adsorbiert	0,6200	20	3
IAPSFAVESIDALK	0,0013	-1,9102	adsorbiert	0,5067	15	2
IGPILDNSTLQSEVKPILEK	0,0072	-2,2316	adsorbiert	-0,1050	20	3
ITPENLPQILLQLK	0,0002	-3,0359	adsorbiert	0,1714	14	2
IYVDDGLISLQVK	0,0001	-3,3928	adsorbiert	0,6231	13	2
LAATNALLNSLEFTK	0,0022	-1,8137	adsorbiert	0,4533	15	2
LAGANPAVITCDELLGHEK	0,0020	-1,0617	adsorbiert	0,3800	20	3
LDILDQER	0,0414	-1,3085	adsorbiert	-0,8000	8	2
LDNLVAILDINR	0,0002	-3,0906	adsorbiert	0,6583	12	2
LFIGGLSFETTDLSLR	0,0030	-3,8578	adsorbiert	0,1688	16	2
LGGSAVISLEGKPL	0,0002	-1,8992	adsorbiert	0,7214	14	2
LICCDILDVLDK	0,0066	-1,1877	adsorbiert	1,2667	12	2
LSSDVLTLLIK	0,0080	-1,0367	adsorbiert	1,2909	11	2
LTTLPDFCGLTHLVK	0,0107	-1,0838	adsorbiert	0,5750	16	3
LVEALCAEHQINLIK	0,0001	-1,5563	adsorbiert	0,6400	15	3
LVSIGAEEIVDGNNAK	0,0002	-1,2941	adsorbiert	0,3533	15	2
NAGNCCLSPAVIVGLLK	0,0046	-1,3813	adsorbiert	1,0188	16	2
NILEESLCELVAK	0,0004	-2,1361	adsorbiert	0,4385	13	2
NVGLDIEAEVPAVK	0,0001	-2,5417	adsorbiert	0,3286	14	2
SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK	0,0005	-5,1612	adsorbiert	0,2304	23	2
SLDLFNCEVTNLNDYR	0,0005	-2,8321	adsorbiert	-0,4625	16	2
SLVASLAEPDFVVTDFAK	0,0026	-3,5492	adsorbiert	0,7167	18	2
SQVFSTAADGQTQVEIK	0,0062	-1,2982	adsorbiert	-0,3235	17	2
TGGLEIDSDFGGFR	0,0037	-1,1952	adsorbiert	-0,3000	14	2
TGLIDYNQLALTAR	0,0005	-1,4926	adsorbiert	0,1000	14	2
TIAECLADELINAAK	0,0003	-2,6290	adsorbiert	0,5133	15	2
TLAQLNPESSLFIIASK	0,0003	-2,2737	adsorbiert	0,4529	17	2
TVAGQDAVIVLLGTR	0,0024	-1,5824	adsorbiert	0,9733	15	2
TVLGTPEVLLGALPGAGGTQR	0,0031	-1,6014	adsorbiert	0,4000	21	2
VDINAPDVQGPDWHLK	0,0075	-1,6715	adsorbiert	-0,5500	18	3
VEEQEPELTSTPNFVVEIK	0,0177	-1,4021	adsorbiert	-0,2950	20	2
VLAQNSGFDLQETLVK	0,0032	-1,3863	adsorbiert	0,0688	16	2
VLDNYLTSPLEEVDETSAAEDEGVNSQR	0,0070	-2,6620	adsorbiert	-0,8296	27	2
VTEGLVDVILYHQPDDK	0,0007	-1,6213	adsorbiert	-0,2294	17	3
VVVQVLAEEPEAVLK	0,0023	-1,5534	adsorbiert	0,8467	15	2
YTPSGQAGAAASESLFVSNHAY	0,0005	-1,9024	adsorbiert	-0,1273	22	2

AALQEELQLCK	0,0026	-1,0485	adsorbiert	-0,0364	11	2
AAVATFLQSVQVPEFTPK	0,0017	-2,6240	adsorbiert	0,4222	18	2
AAVEEGIVLGGGCALLR	0,0001	-2,6805	adsorbiert	1,1235	17	2
ATIAGIPQSIIECVK	0,0001	-3,6336	adsorbiert	1,1500	16	2
ALHSQLQAVPLNELR	0,0102	-1,1585	adsorbiert	0,4400	15	3
ALPFWNEEIVPQIK	0,0026	-1,6429	adsorbiert	-0,0286	14	2
ALTGLATLPLAR	0,0075	-1,1745	adsorbiert	1,2692	13	2
AQTEGINISEEALNHLGEIGTK	0,0172	-1,0241	adsorbiert	-0,4682	22	3
ATENDIANFFSPLNPIR	0,0048	-1,4840	adsorbiert	-0,2765	17	2
DICNDVLSLEK	0,0001	-2,7929	adsorbiert	0,3250	12	2
DIISIAEDEDLRL	0,0076	-1,0149	adsorbiert	-0,3083	12	2
DISEASVFDAYVLPK	0,0014	-2,6849	adsorbiert	0,2800	15	2
DSLIFLVDASK	0,0042	-1,2363	adsorbiert	0,7636	11	2
DYLHLPPEIVPATLR	0,0063	-1,4066	adsorbiert	0,0267	15	3
EGRPSGEAFVELESEDEVK	0,0004	-1,6968	adsorbiert	-1,0579	19	3
EYFSWEGAFQHVGK	0,0257	-1,0062	adsorbiert	-0,7000	14	3
FDQLFDDESDPFEVLK	0,0025	-2,1311	adsorbiert	-0,6625	16	2
FGFPEGSVELYAEK	0,0003	-2,4838	adsorbiert	-0,2500	14	2
FTP GTFTNQIQA FR	0,0045	-1,6091	adsorbiert	-0,1733	15	2
FYALSASFEPFSNK	0,0232	-1,1708	adsorbiert	-0,0286	14	2
GITGVDLFGTTDAVVK	0,0024	-1,3383	adsorbiert	0,7063	16	2
GQCDLELINVCNENSLFK	0,0043	-1,8515	adsorbiert	-0,0944	18	2
GTIEILSDVQLIK	0,0000	-5,0512	adsorbiert	0,6923	13	2
HSSLAGCQIINYR	0,0158	-1,0295	adsorbiert	-0,0692	13	3
IDFYFDENPYFENK	0,0067	-2,9823	adsorbiert	-1,1571	14	2
IGGVQQDTILAEGLHFR	0,0007	-2,0232	adsorbiert	0,1059	17	3
IITITGTQDQIQNQYLLQNSVK	0,0001	-5,0377	adsorbiert	-0,2130	23	2
ILGADTSVDLEETGR	0,0002	-1,1881	adsorbiert	-0,2267	15	2
ISGETIFVTAPHEATAGI GVNR	0,0233	-2,1612	adsorbiert	0,4652	23	3
ISLGLPVGAVIN CADNTGAK	0,0253	-1,0827	adsorbiert	0,7100	20	2
LAPITSDPTEATAVGAEASF K	0,0010	-3,0151	adsorbiert	0,3091	22	2
LDLLTADSPQPPVFK	0,0002	-2,8087	adsorbiert	-0,1600	15	2
LFVGNLPADITEDEFK	0,0257	-1,0577	adsorbiert	-0,0250	16	2
LLIHQS LAGGIIGVK	0,0000	-2,3394	adsorbiert	1,2200	15	3
LLTSFLPAQLLR	0,0004	-2,0806	adsorbiert	1,0417	12	2
LNCE DIDE CR	0,0452	-1,1905	adsorbiert	-0,8700	10	2
LPDIFEAQIAGLR	0,0059	-1,2085	adsorbiert	0,4615	13	2
LQLETEIEALK	0,0001	-3,1260	adsorbiert	-0,0818	11	2
LSVEADINGLR	0,0013	-1,7734	adsorbiert	0,1727	11	2
LVLEVAQHLGESTVR	0,0000	-1,8963	adsorbiert	0,3800	15	3
STGEAFVQFASQEIAEK	0,0309	-1,0016	adsorbiert	-0,2588	17	2
SVDVILDDDLVDK	0,0039	-1,1548	adsorbiert	0,1923	13	2
TFCQLILDPIFK	0,0010	-2,1712	adsorbiert	0,9583	12	2
TFFSFPAVVAPFK	0,0051	-1,4838	adsorbiert	1,1231	13	2
TGDFQLHTNVNDGTEFGGSIYQK	0,0012	-2,4799	adsorbiert	-0,8391	23	3
VALTGLTVAEYFR	0,0036	-1,7050	adsorbiert	0,8692	13	2
VFIGNLNTLVVK	0,0026	-1,2107	adsorbiert	1,2917	12	2
VGWEQLLTTIAR	0,0021	-1,5369	adsorbiert	0,3250	12	2
ATENDIYNFFSPLNPVR	0,0048	-1,8120	adsorbiert	-0,4765	17	2

Tabelle A4: Liste der signifikanten Proteine nach Inkubation in PP-Gefäßen von Hersteller A. (p-Wert < 0,05 und log₂-Fold-Change ≤ -0,58)

Accession-Nummer (UniProt)	Genname	p-Wert	q-Wert (FDR)	log ₂ -Fold-Change
P37108	SRP14	0,0057	0,3104	-0,7982
Q15181	PPA1	0,0168	0,5114	-0,6848
A1L0T0	ILVBL	0,0001	0,0217	-1,4431
P05141	SLC25A5	0,0013	0,1312	-0,8050
O95155	UBE4B	0,0082	0,3439	-0,7163
Q8TEX9	IPO4	0,0082	0,3439	-0,6102
Q15836	VAMP3	0,0089	0,3594	-0,7728
Q8N766	EMC1	0,0027	0,2323	-0,8165
Q9UHY7	ENOPH1	0,0004	0,0708	-1,2269
Q13523	PRP4K	0,0059	0,3104	-0,8136
P10768	ESD	0,0446	0,7661	-0,6115
Q07021	C1QBP	0,0000	0,0056	-1,8665
P04406	GAPDH	0,0126	0,4361	-0,7055
Q96CS3	FAF2	0,0041	0,3052	-0,6384
Q9Y265	RUVBL1	0,0061	0,3104	-0,6201
O43678	NDUFA2	0,0005	0,0746	-1,2341
Q3ZCQ8	TIMM50	0,0302	0,6692	-0,5854
P10321	HLA-C	0,0107	0,3944	-0,8834

O14828	SCAMP3	0,0014	0,1421	-1,0146
P41743	PRKCI	0,0065	0,3104	-0,6914
P68366	TUBA4A	0,0009	0,1139	-1,2022
A6NDG6	PGP	0,0173	0,5163	-0,6592
Q9NR50	EIF2B3	0,0052	0,3104	-0,8491
P49773	HINT1	0,0003	0,0603	-1,1791
P55209	NAP1L1	0,0034	0,2769	-0,8073
P40429	RPL13A	0,0197	0,5504	-0,6184
Q969X6	UTP4	0,0101	0,3850	-1,1486
Q9UBK8	MTRR	0,0268	0,6491	-0,6288
Q96K17	BTF3L4	0,0007	0,0956	-1,3253
Q7L2H7	EIF3M	0,0005	0,0746	-1,0434
P12236	SLC25A6	0,0003	0,0622	-1,0724
P32969	RPL9	0,0061	0,3104	-0,7278
P56134	ATP5MF	0,0002	0,0519	-2,3608
Q92769	HDAC2	0,0200	0,5523	-0,7411
Q15287	RNPS1	0,0223	0,5826	-0,7769
Q9Y295	DRG1	0,0154	0,4862	-0,7276
P52907	CAPZA1	0,0021	0,1950	-1,0828
Q9Y394	DHRS7	0,0001	0,0217	-1,2623
P56545	CTBP2	0,0164	0,5104	-0,7326
Q9H3K6	BOLA2	0,0011	0,1286	-0,9329
Q9NX14	NDUFB11	0,0048	0,3056	-1,4356
O15381	NVL	0,0105	0,3944	-0,7534
P36955	SERPINF1	0,0055	0,3104	-0,8618
P0DMN0	SULT1A4	0,0001	0,0217	-1,3328
Q8WU90	ZC3H15	0,0007	0,0922	-1,0261
P06280	GLA	0,0050	0,3062	-0,8231
P68400	CSNK2A1	0,0108	0,3944	-0,5999
Q9UNF1	MAGED2	0,0291	0,6618	-0,7243
P62829	RPL23	0,0197	0,5504	-0,6566
P04150	NR3C1	0,0047	0,3056	-0,9416
Q13151	HNRNPA0	0,0037	0,2927	-1,0684
P35244	RPA3	0,0278	0,6571	-0,5893
P82933	MRPS9	0,0067	0,3104	-1,0110
P48507	GCLM	0,0010	0,1157	-1,0256
Q06033	ITIH3	0,0012	0,1286	-0,7603
Q99729	HNRNPA0	0,0500	0,7661	-0,6632
P53999	SUB1	0,0449	0,7661	-0,6315
Q9Y3B3	TMED7	0,0004	0,0708	-1,1984
Q9H488	POFUT1	0,0131	0,4424	-0,6152
Q9P287	BCCIP	0,0033	0,2749	-0,6432
O00148	DDX39A	0,0129	0,4409	-0,6253
P09234	SNRPC	0,0385	0,7186	-0,6384
P32320	CDA	0,0079	0,3417	-0,7010
Q15582	TGFBI	0,0305	0,6692	-0,6269
O43674	NDUFB5	0,0046	0,3056	-0,9573
P14406	COX7A2	0,0042	0,3052	-0,7376
P05062	ALDOB	0,0368	0,7145	-0,6045
Q92990	GLMN	0,0004	0,0708	-0,5952
Q13057	COASY	0,0023	0,2075	-0,7904
O75352	MPDU1	0,0143	0,4617	-0,8128
Q9UI30	TRMT112	0,0000	0,0012	-2,6269
Q96M27	PRRC1	0,0101	0,3850	-0,9785
P25787	PSMA2	0,0001	0,0217	-1,7352
O14880	MGST3	0,0090	0,3594	-0,8022
P36969	GPX4	0,0114	0,4045	-0,7247
P46736	BRC3C	0,0067	0,3104	-0,7029
O14656	TOR1A	0,0002	0,0519	-1,3079
Q9Y639	NPTN	0,0192	0,5460	-0,6684
P84077	ARF1	0,0000	0,0052	-1,7652
O43929	ORC4	0,0000	0,0196	-1,8680
P04844	RPN2	0,0039	0,2959	-0,7246
O14579	COPE	0,0144	0,4617	-0,5969
Q9H0U4	RAB1B	0,0120	0,4213	-1,1520
Q8NBQ5	HSD17B11	0,0058	0,3104	-0,9510
P61020	RAB5B	0,0063	0,3104	-0,6762
P63173	RPL38	0,0405	0,7235	-0,7786
P13798	APEH	0,0191	0,5460	-0,6073
Q9BQ69	MACROD1	0,0016	0,1565	-0,9313
Q96QD8	SLC38A2	0,0000	0,0113	-1,8242
Q14141	SEPTIN6	0,0048	0,3056	-0,8029
P82663	MRPS25	0,0093	0,3668	-0,7437

Tabelle A5: Chou und Fasman Neigungen (Propensities). Zuordnung von Aminosäuren als Bildner und Brecher für helikale und β -Faltblatt-Regionen in Proteinen basierend auf P_α - und P_β -Werten (Chou and Fasman, 1974). Zuordnungen: H_α , starker α -Bildner; h_α α -Bildner; I_α , schwacher α -Bildner; i_α , indifferenter α -Bildner; b_α , Brecher; B_α , starker Brecher. H_β starker β -Bildner; h_β β -Bildner; i_β , indifferenter β -Bildner; b_β , Brecher; B_β , starker Brecher.

Aminosäure	P_α	α -Zuordnung
Glu	1,53	H_α
Ala	1,45	
Leu	1,34	
His	1,24	
Met	1,2	h_α
Gln	1,17	
Trp	1,14	
Val	1,14	
Phe	1,12	I_α
Lys	1,07	
Ile	1	
Asp	0,98	
Thr	0,82	i_α
Ser	0,79	
Arg	0,79	
Cys	0,77	
Asn	0,73	b_α
Tyr	0,61	
Pro	0,59	
Gly	0,53	

Aminosäure	P_β	β -Zuordnung
Met	1,67	H_β
Val	1,65	
Ile	1,6	
Cys	1,3	
Tyr	1,29	h_β
Phe	1,28	
Gln	1,23	
Leu	1,22	
Thr	1,2	i_β
Trp	1,19	
Ala	0,97	
Arg	0,9	
Gly	0,81	b_β
Asp	0,8	
Lys	0,74	
Ser	0,72	
His	0,71	B_β
Asn	0,65	
Pro	0,62	
Glu	0,26	

11. Danksagung

Am Gelingen dieser Arbeit waren zahlreiche Menschen beteiligt, denen ich an dieser Stelle herzlich danken möchte.

Zuallererst möchte ich Prof. Hartmut Schlüter danken. Vielen Dank für die unglaublich spannende und lehrreiche Zeit, die ich seit meinem Studium in der Sektion Massenspektrometrie und Proteomanalytik erleben durfte. Seit meiner Masterarbeit und nun auch während der Dissertation hast Du mir die Möglichkeit gegeben, die Grundlagen und die Tiefen der massenspektrometrischen Proteomanalytik kennenzulernen – und meine Faszination für dieses Forschungsfeld ist bis heute ungebrochen. Besonders wertvoll waren die Erfahrungen, die ich durch Besuche nationaler und internationaler Konferenzen sowie durch unsere Aufenthalte an der Fudan-Universität sammeln durfte.

Herrn PD Dr. Markus Perbandt danke ich für die Übernahme der Zweitbegutachtung meiner Dissertation.

Mein Dank gilt außerdem Dr. Diana Hübler und den Kolleginnen und Kollegen der Eppendorf SE für die spannende Zusammenarbeit und den fachlichen Austausch.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Maria Riedner. Danke, dass Du mich immer in meinem Können bestärkt und unterstützt hast, insbesondere in den intensiven Phasen der Arbeit.

Großer Dank gilt der gesamten AG Schlüter. Dr. Manuela Moritz danke ich für ihr offenes Ohr und ihre stets hilfreiche Unterstützung. Ali Biabani, Kilian Müller, Thomas Mair, Antonia Gocke und Paula Nissen danke ich für die tolle Zusammenarbeit, die gegenseitige Unterstützung und die gemeinsamen, teils sehr arbeitsreichen, aber immer bereichernden Stunden in der Core Facility Massenspektrometrische Proteomanalytik. Mein Dank gilt auch Shanshan Zhao und Ayham Moustafa für die immer gute Stimmung und tolle Zeit mit euch. Sönke Harder danke ich für die unterhaltsamen Diskussionen und die gemeinsamen lehrreichen Stunden an den LCs und Massenspektrometern.

Ich möchte auch allen anderen und ehemaligen Mitgliedern der AG Schlüter danken, von denen ich während meiner Promotion viel lernen durfte.

Ebenfalls danke ich Gaby Graack aus der Abteilung Massenspektrometrie des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg sowie Dr. Lucas Defelipe der SPC-Facility am EMBL für die Möglichkeit zur Messung und die wertvolle fachliche Unterstützung.

Abschließend danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich stets motiviert haben. Meinen Eltern danke ich für ihre uneingeschränkte Unterstützung und ihr Vertrauen in mich.

Meinem Freund Nils danke ich von Herzen für seinen Glauben an mich und seine Ermutigung in allen Phasen dieser Arbeit.

12. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Sofern im Zuge der Erstellung der vorliegenden Dissertationsschrift generative Künstliche Intelligenz (gKI) basierte elektronische Hilfsmittel verwendet wurden, versichere ich, dass meine eigene Leistung im Vordergrund stand und dass eine vollständige Dokumentation aller verwendeten Hilfsmittel gemäß der Guten wissenschaftlichen Praxis vorliegt. Ich trage die Verantwortung für eventuell durch die gKI generierte fehlerhafte oder verzerrte Inhalte, fehlerhafte Referenzen, Verstöße gegen das Datenschutz- und Urheberrecht oder Plagiate.

Datum, Unterschrift