

**Massenspektrometrische Charakterisierung von Proteinen aus  
Kondensaten der Pikosekunden-Infrarot-Laserablation**

Mass Spectrometric Characterization of Proteins from condensates of the  
Picosecond Infrared Laser Ablation

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium**

**Dr. rer. nat.**

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Marcel Kwiatkowski**

aus Lübeck

Hamburg, Dezember, 2015

**1. Gutachter: Prof. Dr. Hartmut Schlüter**

**2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Christian Betzel**

**Tag der Disputation: 22.4.2016**

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2013 bis Dezember 2015 am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Institut für Klinische Chemie im Arbeitskreis Massenspektrometrische Proteomanalytik unter Anleitung von Prof. Dr. Hartmut Schlüter angefertigt. Die Arbeit wurde zudem von Prof. Dr. Dr. Christian Betzel vom Fachbereich Chemie der Universität Hamburg betreut.

## I. Publikationsliste

### Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

- Ultrafast extraction of proteins from tissues using desorption by impulsive vibrational excitation.  
**Kwiatkowski M**, Wurlitzer M, Omid M, Ling R, Kruber S, Nimer R, Robertson W, Horst A, Miller RJ Dwayne, Schlüter H.  
 Angew Chem Int Ed. Engl. 2015 Jan 2;54(1):285-8  
 Desorption durch impulsive Anregung intramolekularer Vibrationszustände – eine Methode zur schnellen Extraktion von Proteinen aus intakten Geweben.  
 Angew. Chem. 2015, 127, 287 –290  
 DOI: 10.1002/anie.201407669 (englische Version)  
 DOI: 10.1002/ange.201407669 (deutsche Version)

### Teile dieser Arbeit befinden sich aktuell in der Revision eines Manuskripts:

- Homogenization of human tissues via picosecond-infrared laser (PIRL) ablation: Giving a closer view on the *in-vivo* composition of protein species as compared to mechanical homogenization.  
**Kwiatkowski M**, Wurlitzer M, Kiani P, Nimer R, Omid M, Bußmann T, Bartkowiak K, Kruber S, Uschold S, Steffen P, Lübberstedt J, Küpker N, Petersen H, Knecht R, Hansen NO, Robertson WD, Miller RJD, Schlüter H.  
 Journal of Proteomics.

### Weitere Veröffentlichungen:

- Disseminated tumor cells persist in the bone marrow of breast cancer patients through sustained activation of the unfolded protein response.  
 Bartkowiak K, **Kwiatkowski M**, Buck F, Gorges T. M, Nilse L, Assmann V, Andreas A, Müller V, Wikman H, Riethdorf S, Schlüter H., Pantel K.  
 Cancer Res. 2015 Nov 16. [Epub ahead of print]  
 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3728.
- Quantitative proteomics unveiled: Regulation of DNA double strand break repair by EGFR involves PARP1.  
 Myllynen L\*, **Kwiatkowski M\***, Gleißner L\*, Riepen B, Hoffer K, Wurlitzer M, Petersen C, Dikomey E, Rothkamm K, Schlüter H, Kriegs M.  
 Radiother Oncol. 2015 Sep;116(3):423-30.  
 DOI:10.1016/j.radonc.2015.09.018.

\* **Gleichberechtigte Erstautorenschaft**

- Evaluating the Hypoxia Response of Ruffe and Flounder Gills by a Combined Proteome and Transcriptome Approach.  
Tiedke J, Borner J, Beeck H, **Kwiatkowski M**, Schmidt H, Thiel R, Fabrizio A, Burmester T.  
PLoS ONE. 2015 Aug 14;10(8):e0135911  
DOI:10.1371/journal.pone.0135911.
  
- The Plasmodium falciparum exportome contains non-canonical PEXEL/HT proteins: PEXEL/HT plasticity.  
Schulze J, **Kwiatkowski M**, Borner J, Schlüter H, Bruchhaus I, Burmester T, Spielmann T, Pick C  
Mol Microbiol. 2015 Jul;97(2):301-14  
DOI:10.1111/mmi.13024.
  
- MALDI imaging-based identification of prognostically relevant signals in bladder cancer using large-scale tissue microarrays.  
Steurer S, Singer JM, Rink M, Chun F, Dahlem R, Simon R, Burandt E, Stahl P, Terracciano L, Schlomm T, Wagner W, Höppner W, Omid M, Kraus O, **Kwiatkowski M**, Doh O, Fisch M, Soave A, Sauter G, Wurlitzer M, Schlüter H, Minner S.  
Urol Oncol. 2014 Nov;32(8):1225-33.  
DOI: 10.1016/j.urolonc.2014.06.007.
  
- Rapid MALDI-TOF mass spectrometry strain typing during a large outbreak of Shiga-Toxigenic Escherichia coli.  
Christner M, Trusch M, Rohde H, **Kwiatkowski M**, Schlüter H, Wolters M, Aepfelbacher M, Hentschke M.  
PLoS One. 2014 Jul 8;9(7):e101924.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0101924
  
- Sample displacement batch chromatography of proteins.  
Kotasinska M, Richter V, **Kwiatkowski M**, Schlüter H.  
Methods Mol Biol. 2014;1129:325-38.  
DOI: 10.1007/978-1-62703-977-2\_24.
  
- Elapid snake venom analyses show the specificity of the peptide composition at the level of genera Naja and Notechis.  
Munawar A, Trusch M, Georgieva D, Hildebrand D, **Kwiatkowski M**, Behnken H, Harder S, Arni R, Spencer P, Schlüter H, Betzel C.  
Toxins (Basel). 2014 Feb 28;6(3):850-68.  
DOI: 10.3390/toxins6030850.
  
- MALDI imaging on large-scale tissue microarrays identifies molecular features associated with tumour phenotype in oesophageal cancer.  
Quaas A, Bahar AS, von Loga K, Seddiqi AS, Singer JM, Omid M, Kraus O, **Kwiatkowski M**, Trusch M, Minner S, Burandt E, Stahl P, Wilczak W, Wurlitzer M, Simon R, Sauter G, Marx A, Schlüter H.  
Histopathology. 2013 Oct;63(4):455-62.  
DOI: 10.1111/his.12193.

- Mass spectrometric analysis of protein species of biologics.  
Richter V, **Kwiatkowski M**, Omidi M, Omidi A, Robertson WD, Schlüter H.  
Pharmaceutical Bioprocessing 2013; 1: 381-404.  
DOI: 10.4155/pbp.13.39.
  
- MALDI mass spectrometric imaging based identification of clinically relevant signals in prostate cancer using large-scale tissue microarrays.  
Steurer S, Borkowski C, Odinga S, Buchholz M, Koop C, Huland H, Becker M, Witt M, Trede D, Omidi M, Kraus O, Bahar AS, Seddiqi AS, Singer JM, **Kwiatkowski M**, Trusch M, Simon R, Wurlitzer M, Minner S, Schlomm T, Sauter G, Schlüter H.  
Int J Cancer. 2013; 133:920-8.  
DOI: 10.1002/ijc.28080.
  
- Molecular characterization and evolution of haemocyanin from the two freshwater shrimps *Caridina multidentata* (Stimpson, 1860) and *Atyopsis moluccensis* (De Haan, 1849).  
Marxen JC, Pick C, **Kwiatkowski M**, Burmester T.  
J Comp Physiol B. 2013 Jul;183(5):613-24.  
Doi: 10.1007/s00360-013-0740-9.
  
- Comparison of displacement versus gradient mode for separation of a complex protein mixture by anion-exchange chromatography.  
Ahrends R, Lichtner B, Buck F, Hildebrand D, Trusch M, Kotasinska M, Kohlbacher O, **Kwiatkowski M**, Wagner M, Trusch M, Schlüter H.  
J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2012 Jul 15;901:34-40.  
DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.05.037.
  
- Displacement chromatography as first separating step in online two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry analysis of a complex protein sample-- the proteome of neutrophils.  
Trusch M, Tillack K, **Kwiatkowski M**, Bertsch A, Ahrends R, Kohlbacher O, Martin R, Sospedra M, Schlüter H.  
J Chromatogr A. 2012; 1232. 288-294.  
DOI: 10.1016/j.chroma.2012.02.029.

## II. Vorträge

- Rapid extraction of intact proteins from tissues via desorption by impulsive vibrational excitation.  
Marcel Kwiatkowski. 48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie 2015. Wuppertal, 4.3.2015
- Protein extraction for proteomics by cold vaporization of tissues.  
Marcel Kwiatkowski. 42<sup>nd</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques. Geneva, 24.6.2015
- Down-Scaling of a 2D-LC for bottom-up proteomics by applying displacement chromatography.  
Marcel Kwiatkowski. 42<sup>nd</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques. Geneva, 24.6.2015

# 1 Inhaltsverzeichnis

I.	Publikationsliste .....	4
II.	Vorträge.....	7
1	Inhaltsverzeichnis .....	8
2	Abkürzungen .....	10
3	Zusammenfassung.....	12
4	Abstract .....	14
5	Einleitung.....	15
5.1	Proteinspezies.....	15
5.2	Proteinextraktion aus Gewebeproben .....	16
5.3	Desorption durch impulsive Anregung von intramolekularen Vibrationszuständen - Kalte Gewebeerwärmung mit dem Pikosekunden-Infrarot Laser .....	18
6	Aufgabenstellung .....	20
7	Ergebnisse .....	21
7.1	Analyse der chemischen Zusammensetzung der RNase A vor und nach PIRL-Ablation .....	21
7.1.1	Vergleich der RNase A vor und nach PIRL-Ablation auf Ebene der tryptischen Peptide .....	22
7.1.2	Massenspektrometrische Analyse der intakter RNase A vor und nach PIRL- Ablation mit der MALDI-MS .....	47
7.1.3	Massenspektrometrische Analyse der intakten RNase A vor und nach PIRL- Ablation mit der LC-ESI-MS .....	48
7.1.4	Vergleich der chemischen Zusammensetzung der zweiten RNase A-Charge vor und nach PIRL-Ablation auf Peptid- und Proteinebene mit der MALDI-MS und der LC- ESI-MS .....	52
7.2	Vergleich der chemischen Zusammensetzung von Phosphoproteinen vor und nach PIRL Ablation mit der MALDI-MS .....	52
7.2.1	Massenspektrometrische Analyse PIRL-ablatierter Phosphoproteine auf der Proteinebene mit der MALDI-MS.....	52
7.2.2	Vergleich der tryptischen Phosphopeptide der Caseine vor und nach Ablation mit der MALDI-MS.....	54
7.3	Experimente zur Untersuchung der Enzymaktivitäten von Proteasen nach der PIRL- Ablation .....	57
7.3.1	Untersuchung der enzymatischen Aktivität von Trypsin nach PIRL-Ablation....	57
7.3.2	Untersuchung der enzymatischen Aktivität von Angiotensin I metabolisierenden Enzymen nach der PIRL-Ablation von humanen Blutplasma .....	61
7.4	Experimente zur Freisetzung von Proteinen aus Geweben durch PIRL-Ablation .....	63
7.4.1	PIRL Ablation von Proteinen aus murinen Muskelgewebe.....	63
7.4.2	Nachweis eines durch PIRL freigesetzten Proteins aus dem PIRL-DIVE- Kondensat mittels Western Blot-Analyse .....	65
7.4.3	Vergleich der Proteinzusammensetzung von Proteinextrakten humaner Tonsillen nach PIRL-Ablation und nach konventioneller, mechanischer Homogenisierung .....	66
8	Diskussion.....	84



9	Materialien und Methoden .....	104
9.1	PIRL-DIVE Ablation.....	104
9.2	Experimente zur Analyse der chemischen Zusammensetzung von PIRL-ablatierten Proteinen.....	104
9.2.1	Analyse der chemischen Zusammensetzung PIRL-ablatierter RNase A Moleküle .....	104
9.2.2	Analyse der chemischen Zusammensetzung von Phosphoproteinen vor und nach PIRL-Ablation .....	109
9.3	Experimente zur Untersuchung der Enzymaktivitäten von PIRL-ablatierten Proteinen.....	111
9.3.1	Untersuchung der enzymatischen Aktivität von Trypsin nach PIRL-Ablation..	112
9.3.2	Untersuchung der enzymatischen Aktivität von Angiotensin-I-metabolisierenden Enzymen nach der PIRL-Ablation von humanen Blutplasma .....	114
9.4	Experimente zur Gewinnung von Proteinen aus Geweben mittels PIRL-Ablation .	116
9.4.1	Experimente mit murinen Gewebeproben .....	116
9.4.2	Experimente mit humanen Tonsillen .....	118
9.4.3	Tryptischer In-Gel-Verdau .....	121
9.5	Massenspektrometrische Analyse.....	121
9.5.1	MALDI-MS.....	121
9.5.2	LC-ESI-MS.....	123
9.6	Materialien .....	131
9.6.1	Geräte.....	131
9.6.2	Chemikalien .....	132
9.6.3	Biomaterialien .....	133
9.6.4	Verbrauchsmaterialien.....	133
9.6.5	Software .....	134
10	Literatur.....	135
11	Anhang.....	143
11.1	Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS .....	143
11.2	Abbildungen .....	145
11.3	Tabellen.....	163
12	Danksagung .....	164
13	Eidesstattliche Versicherung .....	166
14	KMR-Stoffe .....	167

## 2 Abkürzungen

ACN	Acetonitril
AGC	Automatic Gain Control
a.u.	willkürliche Einheiten (engl. arbitrary units)
BPC	Basis-Peak-Chromatogramm
DDA	Datenabhängiger Aufnahmemodus (engl.: Data Dependant Aquisition)
DH	PIRL-DIVE-Homogenat
DHAP	2,5-Dihydroxyacetophenon
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIVE	Desorption durch impulsive Anregung von intramolekularen Vibrationszuständen (engl.: Desorption by Impulsive Vibrational Excitation)
DTH	PIRL-DIVE-Gewebehomogenisierung (engl.: PIRL-DIVE-Tissue-Homogenization)
EIC	Extrahiertes Ionenchromatogramm
ESI	Elektrosprayionisierung
FA	Ameisensäure
FDA	US Food and Drug Administration
FWHM	Halbwertsbreite (engl.: Full Width at Half Maximum)
GA	Glycolsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Phosphorsäure
IT	Ionenfalle
LC	Flüssigchromatographie
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation-Massenspektrometrie
MH	konventionelles, mechanisches Homogenat
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie

MTH	konventionelle, mechanische Gewebehomogenisierung (engl.: Mechanical Tissue Homogenizaton)
Na	Natrium
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Ammoniumbicarbonat
NH <sub>4</sub> OH	Ammoniumhydroxid
nanoUPLC	Nano-Ultrahochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
ESI-Q-IT-OT-MS	Elektrosprayionisation-Quadrupol-Ionenfallen-Orbitrap-Massenspektrometer
UPLC-ESI-Q-TOF-MS	Elektrosprayionisation-Quadrupol-Flugzeitmassenanalysator-Massenspektrometer
OD	Außendurchmesser
OT	Orbitrap
PIRL	Pikosekunden-Infrarot-Laser
Q	Quadrupol
RP	Umkehrphase (engl.: Reversed Phase)
RP-Chromatographie	Umkehrphasenchromatographie
rpm	Umdrehungen pro Minute
TFA	Trifluoressigsäure
Th	Thomson
TOF	Flugzeitmassenanalysator

### 3 Zusammenfassung

Proteinspezies sind als die kleinste Einheit des Proteoms definiert. Die Funktion einer Proteinspezies ist abhängig von ihrer exakten chemischen Zusammensetzung und bereits minimale Änderungen können eine Veränderung der Funktion bewirken. Für die Erforschung zellulärer, molekularer Mechanismen auf der Proteinebene ist es deshalb wichtig, Proteinspezies möglichst in ihrer *in-vivo* Form zu erfassen. Bei der Extraktion von Proteinen aus Geweben besteht die Gefahr, dass Proteinspezies durch enzymatische und chemische Reaktionen verändert werden. Die kalte Verdampfung von Geweben mit dem Pikosekunden-Infrarot-Laser (PIRL) ist ein sehr schonendes Verfahren zur Homogenisierung von Geweben. In der vorliegenden Arbeit wurde der Hypothese gefolgt, dass die chemische Zusammensetzung von Proteinspezies durch die PIRL-Ablation nicht verändert wird. Es konnte mit verschiedenen massenspektrometrischen Verfahren gezeigt werden, dass sich die chemische Zusammensetzung des Modellproteins RNase A sowie der Phosphoproteine Alpha-S1-, Alpha-S2 und Beta-Casein durch die PIRL-Ablation nicht verändert. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass sowohl Trypsin als auch Proteasen des humanen Blutplasmas nach der PIRL-Ablation enzymatisch aktiv waren, was gegen eine signifikante Denaturierung der Proteinspezies während der PIRL-Ablation spricht. Die Kondensate der Aerosole, die durch die Gewebeverdampfung mit dem PIRL gewonnen wurden, konnten ohne weitere Probenvorbereitung direkt auf die SDS-PAGE aufgetragen werden und die getrennten Proteine ließen sich sowohl massenspektrometrisch als auch mittels Western-Blot-Analyse nachweisen. Im Vergleich zur konventionellen Gewebekomogenisierung und Proteinextraktion konnte mit der PIRL-Ablation eine deutlich höhere Proteinausbeute erzielt werden. Die PIRL-Proteinextrakte humaner Tonsillen wiesen erheblich geringere Proteolyseprodukte und deutlich mehr Proteinspezies auf als die konventionell gewonnenen Proteinextrakte. Aus diesen Ergebnissen wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die PIRL-Ablation einen genaueren Blick auf die Proteinspezies-Zusammensetzung von Geweben *in-vivo* ermöglicht. Aufgrund der ultraschnellen und schonenden Verdampfung von Geweben sind intakte Proteinspezies bei der PIRL-Ablation enzymatischen Abbaureaktionen nur innerhalb eines äußerst kurzen Zeitraums ausgesetzt. Die explosionsartige, aber dennoch schonende Überführung von Geweben in Aerosole dürfte für die nahezu Partikel-freien Homogenate und damit für die hohen Proteinausbeuten sowie die hohe Anzahl von

identifizierten Proteinspezies verantwortlich gewesen sein. In dieser Arbeit ist es gelungen, die Hypothese zu verifizieren, dass Proteinspezies intakt und mit hohen Ausbeuten aus Geweben gewonnen werden können, was die zukünftige Erforschung von Proteomen auf der Spezies-Ebene erleichtern sollte.

## 4 Abstract

Protein species are defined as the smallest unit of the proteome. The function of a protein species depends on its exact chemical composition. Even small changes in its composition can change its function. For investigation of molecular mechanisms in cells on the protein level it is therefore important to detect protein species in their *in-vivo* state. During protein extraction from tissues there is a risk that the chemical compositions of protein species is changed by both enzymatic and chemical reactions. Cold tissue vaporization by the picosecond infrared laser (PIRL) represents a soft procedure for homogenizing tissue samples. Thus, this thesis was investigating the hypothesis that the chemical composition of protein species is not changed by PIRL ablation. It has been shown with different mass spectrometry methods that the chemical composition of RNase A as well as the chemical composition of the phosphoproteins alpha-S1-, alpha-S2- and beta-casein was not changed by PIRL ablation. In addition, trypsin as well as proteases in human blood plasma were still enzymatically active after PIRL ablation, which indicates that proteins are not significantly denatured during PIRL ablation. It was possible to load condensates from PIRL generated tissue aerosols directly on a SDS-PAGE and to detect the separated proteins by mass spectrometry and Western Blot analysis. The total protein yield was considerably higher using PIRL ablation for tissue homogenization and protein extraction compared to a conventional approach. Furthermore, PIRL derived protein extracts from human tonsils showed a substantially lower number of proteolysis products and a considerably higher number of protein species compared to conventional protein extracts. From these results, it was concluded that the PIRL ablation enables a closer look at the protein species composition of tissues *in-vivo*. Due to the ultrafast, cold and soft tissue vaporization, intact proteins are exposed to a significantly lesser extend to enzymatic degradation reactions through proteases and other enzymes. The explosive but gentle transformation of tissues into aerosols presumably is the reason for the generation of homogenates, which are almost free of particles and therefore responsible for the high protein yield and the high number of identified protein species. In summary, in this thesis confirmed the hypothesis that protein species are transferred intact from tissues into tissue homogenates via PIRL ablation. Thus, PIRL ablation in the future should make the investigation of proteomes on the species level more reliable with respect to their original *in-vivo* composition.

## 5 Einleitung

### 5.1 Proteinspezies

Die Bezeichnung „Proteom“ wurde erstmals 1994 von dem Australier Marc R Wilkins in Analogie zu dem Begriff „Genom“ verwendet [1]. Das Proteom ist definiert als die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt unter definierten Bedingungen [2, 3]. Durch posttranslationale und posttranskriptionale Modifizierungen entstehen aus einem Gen eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine, die sich jeweils in ihrer exakten chemischen Zusammensetzung voneinander unterscheiden und als Proteinspezies bezeichnet werden [4, 5]. Die Proteinspezies bilden die kleinste funktionelle Einheit des Proteoms. Der Umfang der Proteinspezies des humanen Proteoms wird auf ungefähr  $10^9$  Proteinspezies geschätzt [6], deren dynamischer Bereich ca. 12 Größenordnungen beträgt [7]. Die Funktion einer Spezies ist abhängig von seiner exakten chemischen Zusammensetzung. Bereits kleine Änderungen der exakten chemischen Zusammensetzung eines Genprodukts können zu einer signifikanten Änderung seiner Funktion führen. Um die Funktionen der Genprodukte verstehen zu können, ist es notwendig, das Proteom auf der Ebene der Proteinspezies zu analysieren [8]. Bei dem Protein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) handelt es sich z.B. um ein im Cytosol lokalisiertes, abundantes Enzym der Glykolyse. Wird GAPDH in Gegenwart hoher NO-Konzentrationen nitrosyliert, ändert sich die chemische Zusammensetzung und es entsteht eine neue Proteinspezies (GAPDH-NO). Diese Proteinspezies interagiert mit dem Protein Siah1 und bildet einen Proteinkomplex (GAPDH-NO-Siah1), der in den Zellkern transportiert wird und dort apoptotische Prozesse auslöst [9]. Bei den meisten proteomanalytischen Methoden wird das zu analysierende Proteingemisch tryptisch verdaut und die resultierenden Peptide massenspektrometrisch analysiert (Bottom-Up-Massenspektrometrie) [10, 11]. Für die Identifizierung der Proteine werden die Fragmentspektren der Peptide gegen eine genom-basierte Proteindatenbank gesucht. Die Ergebnisse der LC-MS/MS-Analyse stellt somit das Inventar der Genprodukte auf der Proteinebene dar. Bedingt durch den tryptischen Verdau ist eine Erfassung der verschiedenen individuellen Proteinspezies, die von einem einzigen Gen kodiert werden, sich aber in ihrer chemischen Zusammensetzung unterscheiden, nicht möglich. Um diese unterschiedlichen Proteinspezies identifizieren zu können, darf die Korrelation zur ursprünglich vorhandenen, intakten Proteinspezies nicht verloren gehen. Dies

kann z.B. dadurch erreicht werden, dass die Proteinspezies intakt mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2DE) voneinander getrennt werden [12, 13]. Die intakten Proteinspezies müssen für die massenspektrometrische Analyse tryptisch verdaut und aus dem 2DE-Gel extrahiert werden. Doch geht bei dem 2DE-basierten Ansatz die direkte Korrelation zwischen dem zu analysierenden Peptid und der ursprünglich intakten Proteinspezies nicht verloren. Allerdings ist es mit dem 2DE-basierten Ansatz nicht möglich, die komplette chemische Zusammensetzung der Proteinspezies analytisch zu erfassen. Generell ist es aktuell nicht möglich, für eine Proteinspezies eine 100%ige Sequenzabdeckung und vollständige Aufklärung aller PTMs zu erreichen [14]. Alternativ können Proteinspezies nach Fraktionierung direkt und intakt ins Massenspektrometer infundiert werden, um in diesem nach Fragmentierung in der Gasphase die Spezies zu identifizieren (Top-Down-Massenspektrometrie) [10]. Doch auch mit den aktuellen Methoden der Top-Down-Massenspektrometrie ist es nicht möglich, eine 100%ige Aufklärung der exakten chemischen Zusammensetzung zu erreichen. Die analytische Aufklärung der exakten chemischen Zusammensetzung einzelner Proteinspezies und damit auch von Spezies auf der Proteomebene befindet sich nach wie vor in ihren Anfängen. Um eine vollständige Aufklärung der chemischen Zusammensetzung von Proteinspezies und Spezies auf der Proteomebene zu erreichen, müssen neue Methoden entwickelt werden, die alle Ebenen der Proteinanalytik beinhalten. Dies beinhaltet die Entwicklung neuer Methoden zur Extraktion und Trennung von Proteinspezies sowie deren massenspektrometrische Analyse und Algorithmen für die Interpretation der extrem komplexen Spektren.

## **5.2 Proteinextraktion aus Gewebeproben**

Bei der Extraktion von Proteinen aus Geweben handelt es sich um einen zeitintensiven und kritischen Schritt in jedem protein- bzw. proteomanalytischen Experiment. Für eine effiziente Proteinextraktion muss aus dem Gewebe ein feines Homogenat hergestellt werden. Während der Homogenisierung werden die zellulären Strukturen des Gewebes aufgebrochen und die Proteine aus ihren Kompartimenten freigesetzt. Die Art der Homogenisierung hängt von der Beschaffenheit des zu homogenisierenden Gewebes ab. Während bei weichen Geweben wie z.B. Gehirn eine Homogenisierung durch Ultraschallbehandlung möglich ist [15], müssen die meisten Gewebe wie z.B. Leber, Muskel, Knochen oder Knorpel durch mechanische Verfahren homogenisiert werden [16]. Neben der Homogenisierung ist die Wahl eines geeigneten Extraktionspuffers von entscheidender Bedeutung. Eine Abweichung vom optimalen pH-Wert



kann dazu führen, dass die Proteine denaturieren, und unter Umständen müssen dem Puffersystem Additive hinzugefügt werden, um Proteine, Enzyme oder Protein-Protein-Interaktionen zu stabilisieren [17]. Darüber hinaus muss gewährleistet sein, dass die chemische Zusammensetzung der zu analysierenden Proteine durch Komponenten des Puffersystems nicht verändert wird. Vallierre-Douglas *et al.* beschrieben in 2010 mit der Acetonierung eine neue Modifizierung von Lysinresten und dem Protein-N-Terminus, die durch Fe(III)-haltige Citratpuffer verursacht werden [18]. Durch Lichteinstrahlung kommt es zu einem photochemischen Abbau von Citratmolekülen durch Elektronenabstraktion von Fe(III), wodurch Acetoacetat-Radikale gebildet werden, die unter CO<sub>2</sub>-Abspaltung die Aminogruppen von Proteinen irreversibel modifizieren. Ein weiteres Beispiel wäre die Modifizierung von Aspartat- und Glutamatresten durch ethanolaminhaltige Puffersysteme. Durch die Verwendung von Ethanolamin kann es zu einer irreversiblen Amidbindung zwischen der Carboxylgruppe der Aminosäureseitenkette und dem primären Amin des Ethanolamins kommen [19]. Die Verwendung von Puffersystemen, die Hydroxylamin enthalten, kann ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der chemischen Heterogenität führen, da Asparagin- und Glutaminsäurereste durch Hydroxylamin in die jeweils korrespondierende Hydroxamsäure umgewandelt werden können [20, 21]. Nach dem Zellaufschluss werden nicht lösliche Komponenten und Partikel wie z.B. Zellbruchstücke entfernt und die Proteine von anderen Biomolekülen und kleinen organischen Verbindungen abgetrennt. Dies kann durch spezifische Zentrifugations- und Präzipitationsverfahren oder eine Kombination aus beiden erreicht werden [22, 23]. Aufgrund der unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften der Proteine ist es momentan nicht möglich, die Gesamtheit aller Proteinspezies aus einem Gewebe zu extrahieren. Die meisten Verfahren sind darauf ausgelegt, eine definierte Gruppe von Proteinspezies aus einem Gewebe zu extrahieren, und beinhalten eine Reihe verschiedener experimenteller Schritte [24-27]. Während der Homogenisierung und der Proteinextraktion kann es durch enzymatische Reaktionen (Proteasen, Phosphatasen und andere Enzyme) zu einem Abbau von Proteinspezies und damit zu einer Änderung der chemischen Zusammensetzung des zu analysierenden Gewebeproteoms kommen. Um die enzymatischen Aktivitäten während der Probenvorbereitung zu inhibieren bzw. zu deaktivieren, werden häufig Inhibitoren (z.B. Protease- oder Phosphataseinhibitoren), spezifische Präzipitationsverfahren und pH-Werte sowie die Denaturierung durch Hitzeeinwirkung und Mikrowellenstrahlung verwendet [15, 28, 29]. Allerdings ist es nach wie

vor nicht möglich, während der Homogenisierung und Probenaufarbeitung die enzymatische Aktivitäten reproduzierbar zu inhibieren [29-31]. Die proteomanalytischen Daten zeigen daher meist eine Mischung des *in-vivo* und des *in-vitro* Zustands der entsprechenden chemischen Zusammensetzung des Gewebeproteoms [32, 33]. Je mehr Zeit die entsprechenden Enzyme während der Probenvorbereitung haben, desto größer sind die aufarbeitungsbedingten Modifizierungen. Es wäre daher erstrebenswert, Methoden zu entwickeln, die es ermöglichen, eine möglichst große Zahl individueller Proteinen in großer Menge in einer möglichst kurzen Zeit und in einem einzigen experimentellen Schritt aus intakten Geweben zu extrahieren, ohne deren exakte chemische Zusammensetzung zu verändern.

### **5.3 Desorption durch impulsive Anregung von intramolekularen Vibrationszuständen - Kalte Gewebeverdampfung mit dem Pikosekunden-Infrarot Laser**

Die Forschungsgruppe von Prof. Dr. R. J. Dwayne Miller hat kürzlich ein neues Lasersystem für die medizinische Laserchirurgie entwickelt [34]. Bei dem Laser handelt es sich um einen Pikosekunden-Infrarot-Laser (PIRL). Amini-Nik *et al.* publizierten 2010 eine Wundheilstudie, in der Sie das PIRL-Skalpell mit einem Mikrosekunden-Er:YAG-Laser und einem klassischen Skalpell verglichen [34]. Die Ergebnisse der Wundheilstudie zeigen, dass das PIRL-Skalpell mit einer deutlich geringeren Wundzonenausbildung und mit einer geringeren Narbenbildung assoziiert ist. Die beobachteten Ergebnisse wurden mit der sehr schonenden und kalten Gewebsverdampfung des PIRL erklärt. Sowohl Jowett *et al.* [35] als auch Böttcher *et al.* [36] zeigen, dass die Schädigung des Gewebes durch Thermokoagulation bei der PIRL-Ablation signifikant geringer ist als bei der Ablation mit einem CO<sub>2</sub>- oder einem Er:YAG-Laser. Darüber hinaus zeigen Böttcher *et al.* in ihrer Arbeit, dass bei der PIRL-Ablation die Kollagenfasern an der Schnittkante der Ablationszone des zurückgebliebenen Gewebes intakt vorlagen, wohingegen bei der Ablation mit dem CO<sub>2</sub>- und Er:YAG-Laser weitestgehend denaturierte und karbonisierte Kollagenfasern beobachtet wurden [36]. Die Wellenlänge des PIRL ist mit 3  $\mu\text{m}$  so abgestimmt, dass der Laser speziell die Streckschwingung der O-H Bindung in den Wassermolekülen anregt. Ein wesentliches Merkmal der PIRL-Ablation ist der impulsive und selektive Phasenübergang der gewebseigenen Wassermoleküle. Durch den impulsiven und selektiven Phasenübergang der Wassermoleküle wird eine unkontrollierte Nukleation verhindert, wodurch eine Schädigung des angrenzenden Gewebes und der sich darin

befindenden Proteine durch Schockwellen verhindert wird [37, 38]. Darüber hinaus ist die Zeitskala des Ablationsprozesses bei der PIRL-Ablation von entscheidender Bedeutung. Die Zeitskala des Ablationsprozesses ist so kurz, dass die thermische Energie der Wassermoleküle nicht durch Kollisionen auf die Proteine im Gewebe übertragen werden kann. Die Ursache hierfür ist eine einzigartige Eigenschaft der Wassermoleküle. Die Vibrationszustände des Wassermoleküls sind sowohl innerhalb eines einzelnen Moleküls als auch unter benachbarten Wassermolekülen stark gekoppelt. Dies führt zu extrem kurzen Relaxationszeiten. Die Übertragung der Laserenergie über die direkte Anregung von Vibrationszuständen des Wassermoleküls hin zur Translationsenergie geschieht auf einer Zeitskala von 100 fs, was um etwa ein Hundertfaches schneller ist als die thermische Relaxation der Proteine [39, 40]. Dieser quantenmechanische Effekt wird als Desorption durch impulsive Anregung von intramolekularen Vibrationszuständen (DIVE – Desorption by Impulsive Vibrational Excitation) bezeichnet [41]. Franjic stellte in seiner 2009 publizierten Arbeit die Hypothese auf, dass Proteine durch den DIVE-Prozess aus Geweben in die Gasphase transportiert werden, ohne dass es durch thermische oder akustische Energie zu einer Schädigung der Proteine kommt [37].

## 6 Aufgabenstellung

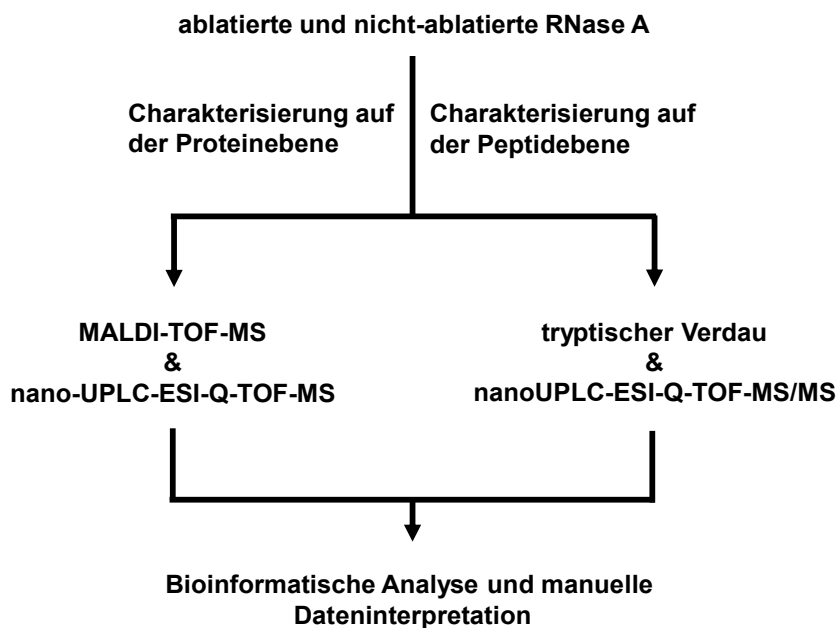
Basierend auf den Arbeiten von Franjic *et al.* [37, 38], Cowan *et al.* [39], Amini-Nik *et al.* [34], Jowett *et al.* [35] und Böttcher *et al.* [36] wurde in dieser Arbeit der Hypothese gefolgt, dass Proteine durch die PIRL-Ablation intakt in die Gasphase transportiert werden. Es wurde geprüft, ob sich die exakte chemische Zusammensetzung der Proteine durch die PIRL-Ablation, den Phasentransfer oder Prozesse innerhalb der Gasphase verändert. Darüber hinaus wurde die Hypothese untersucht, dass es sich bei der PIRL-Ablation und dem DIVE-Prozess um ein neues, sanftes und ultraschnelles Verfahren handelt, um Proteine aus Gewebeproben freizusetzen. Hierfür wurden verschiedene Gewebe mit dem PIRL bestrahlt und die Kondensate des PIRL-Aerosols mit verschiedenen Methoden der Protein- und Proteomanalytik analysiert.

## 7 Ergebnisse

### 7.1 Analyse der chemischen Zusammensetzung der RNase A vor und nach PIRL-Ablation

Die RNase A (RNAS1\_BOVINE) wurde als Modellprotein verwendet, um zu untersuchen, ob sich die chemische Zusammensetzung der Proteine durch den PIRL-DIVE-Prozess verändert. Hierfür wurden Stammlösungen von zwei verschiedenen RNase A-Chargen mit dem PIRL ablatiert. Die Ablationsprodukte wurden massenspektrometrisch analysiert und mit einer nicht-ablatierten Kontrollprobe verglichen (Schema 1).

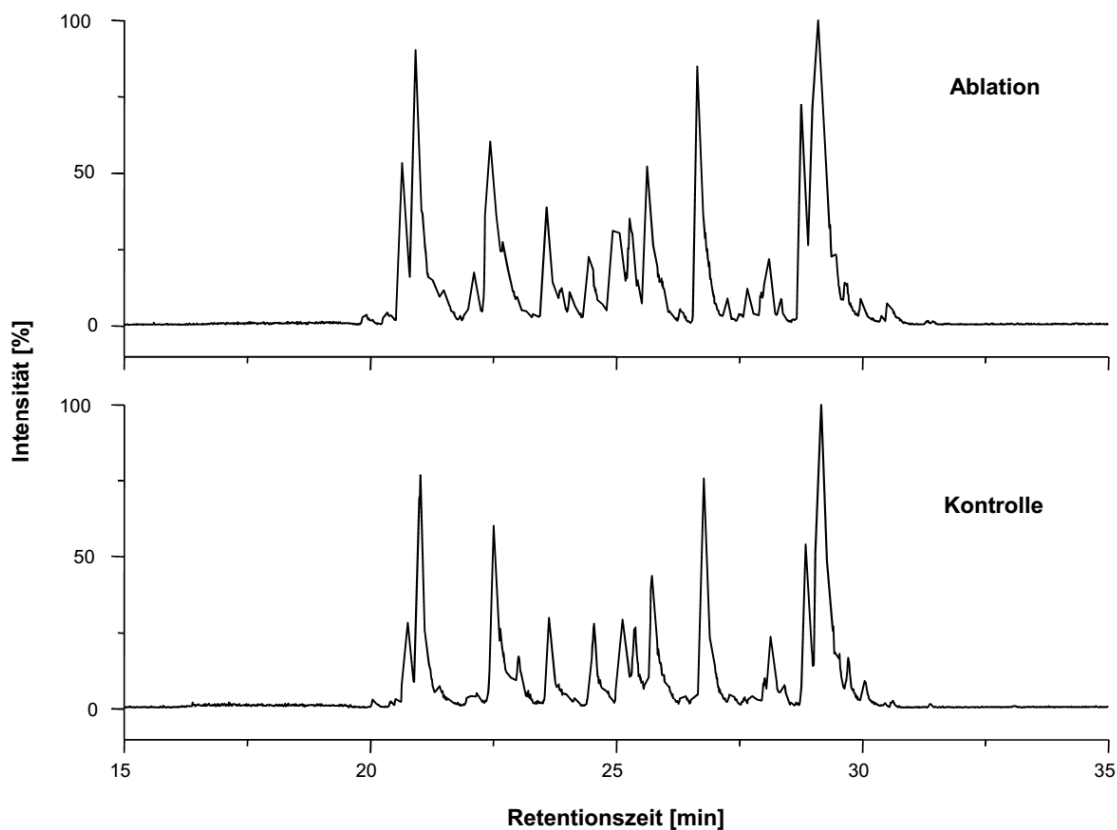
Schema 1: Schematische Darstellung der massenspektrometrischen Analyse der ablatierten und nicht-ablatierten RNase auf der Protein- und Peptidebene.



## 7.1.1 Vergleich der RNase A vor und nach PIRL-Ablation auf Ebene der tryptischen Peptide

### 7.1.1.1 Vergleich der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor und nach PIRL-Ablation

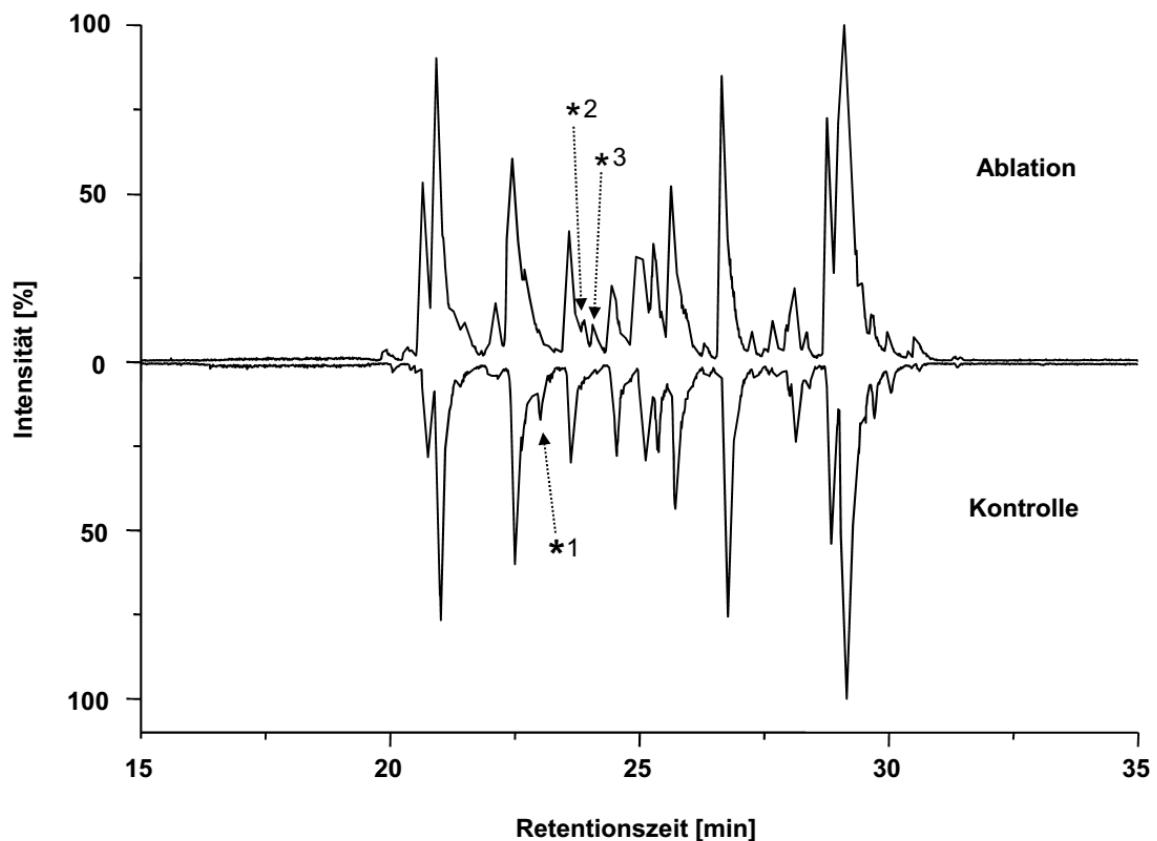
In Abbildung 1 sind die Basis-Peak-Chromatogramme (BPCs) der LC-MS/MS-Analysen der tryptischen Peptide der RNase A nach der PIRL-Ablation (Ablation) und vor der PIRL-Ablation (Kontrolle) wiedergegeben. Die beiden Chromatogramme sehen weitestgehend identisch aus. Die Peptide eluierten in einem Retentionszeitsfenster (RT-Fenster) zwischen 20 min und 33 min. Alle abundanten Signale im Chromatogramm der ablatierten RNase A (Ablation) wurden auch im Chromatogramm der nicht-ablatierten RNase A (Kontrolle) detektiert.



**Abbildung 1: Basis-Peak-Chromatogramme (BPCs) der LC-MS/MS-Analyse des tryptischen Verdaus der RNase A nach der PIRL-Ablation (Ablation, oben) und vor der PIRL-Ablation (Kontrolle, unten).** Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Retentionszeit [min].

Um die Chromatogramme besser miteinander vergleichen zu können, wurden sie einander gegenübergestellt (Abbildung 2). Hierbei konnten drei Signale identifiziert werden, die jeweils

nur in einem der beiden Chromatogramme vorhanden waren. Diese Signale sind in den Chromatogrammen mit einem Stern und einer Zahl gekennzeichnet. Von den drei Signalen wurde ein Signal (\*1) nur im Chromatogramm der RNase vor der PIRL-Ablation (Kontrolle) und zwei Signale (\*2, \*3) nur im Chromatogramm der RNase A nach der PIRL-Ablation (Ablation) detektiert. Um festzustellen, ob die Signale tatsächlich ausschließlich in der Probe nach der PIRL-Ablation bzw. in der Probe vor der PIRL-Ablation vorhanden waren, wurden die MS-Spektren der entsprechenden RT-Bereiche manuell analysiert.

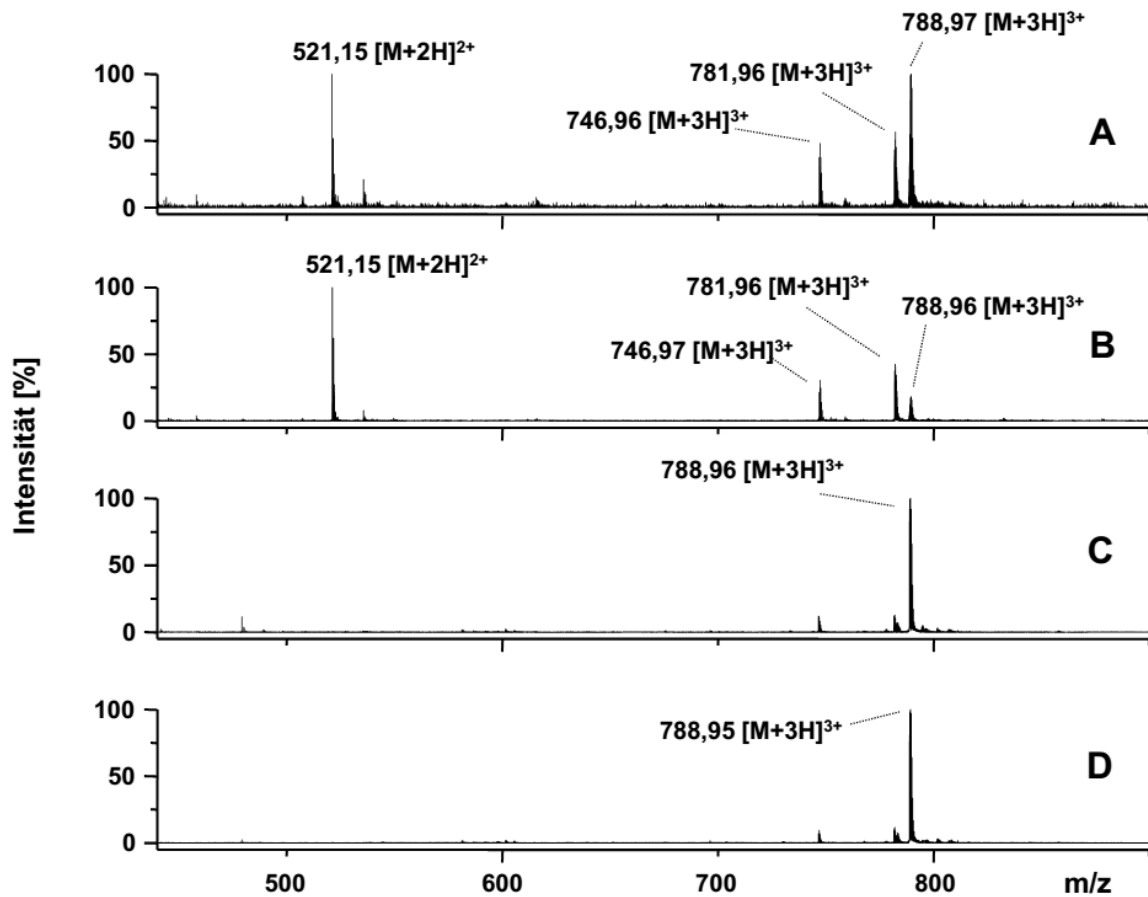


**Abbildung 2:** Gegenüberstellung der Basis-Peak-Chromatogramme der LC-MS/MS-Analyse des tryptischen Verdau der RNase A nach der PIRL-Ablation (Ablation, oben) und vor der PIRL-Ablation (Kontrolle, unten). \*1: Signal im Chromatogramm der Kontrolle, welches nicht im Chromatogramm der RNase A nach der PIRL-Ablation vorhanden war. \*2, \*3: Signale im Chromatogramm der RNase A nach der PIRL-Ablation, die nicht im Chromatogramm der RNase A vor der PIRL-Ablation vorhanden waren. Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Retentionszeit [min].

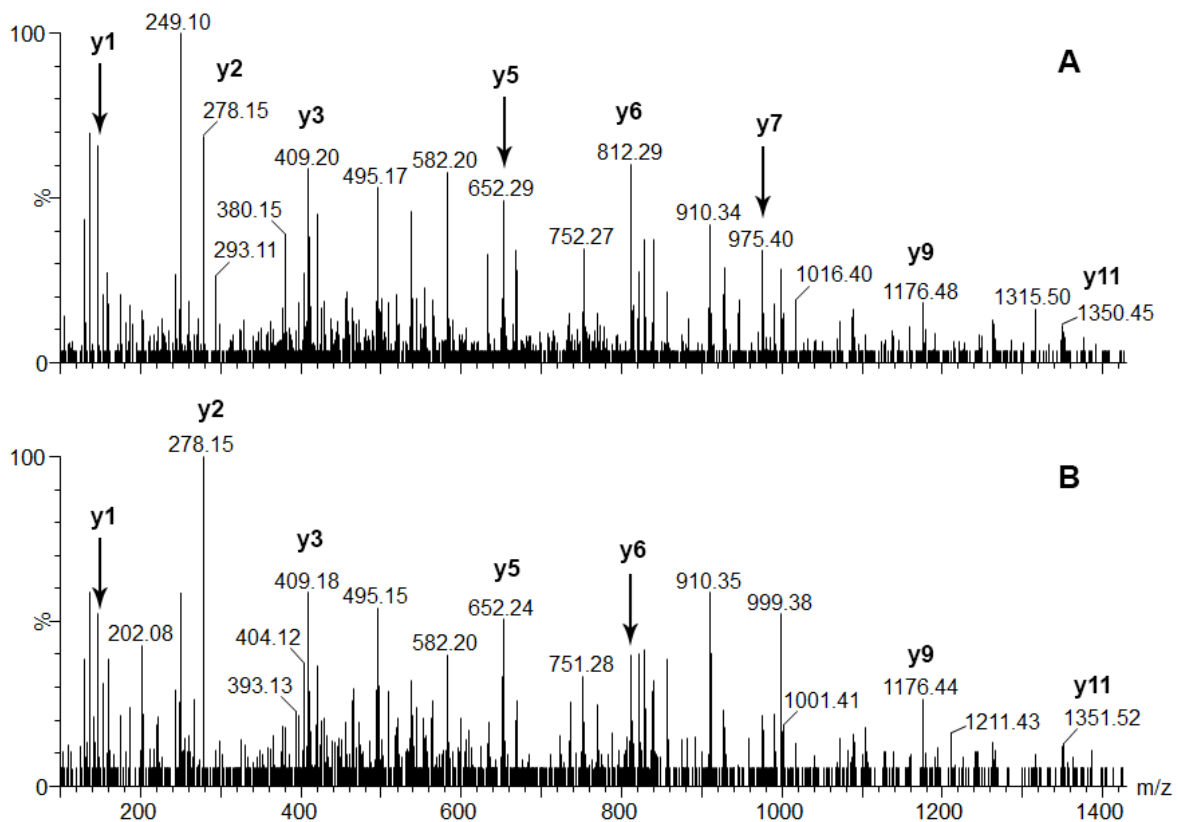
Das Chromatogramm der RNase A vor PIRL-Ablation (Kontrolle) zeigte bei einer Retentionszeit (RT) von 23,02 min einen Schulterpeak (Abbildung 2, \*1), der im Chromatogramm der RNase A nach PIRL-Ablation (Ablation) nicht zu erkennen war. Die Analyse der MS-Spektren zeigte, dass

dieses Signal im Chromatogramm der Kontrolle durch ein zweifach geladenes Signal mit einem  $m/z$  Wert von 521,15 (Abbildung 3 B) hervorgerufen wurde. Das Fragmentspektrum lässt vermuten, dass es sich bei dem Signal um ein Peptid handelte (Abbildung 46 B, Anhang). Die Qualität des Fragmentspektrums reichte allerdings nicht aus, um die Aminosäuresequenz des Peptids mit Hilfe einer Datenbanksuche oder einer De-Novo-Sequenzierung zu identifizieren. Um zu untersuchen, ob dieses Signal nur in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation vorhanden war, wurden die MS-Spektren des entsprechenden RT-Bereichs der RNase A nach PIRL-Ablation manuell analysiert. Das in Abbildung 3 A dargestellte MS-Spektrum zeigte, dass das Peptid mit einem  $m/z$ -Wert von 521,15  $[M+H]^{2+}$  in der Probe nach der PIRL-Ablation ebenfalls vorhanden war. Die Qualität des Fragmentspektrums reichte ebenfalls nicht aus, um die Aminosäuresequenz zu identifizieren (Abbildung 46 A, Anhang). Das Muster der Fragmentationen der beiden Fragmentspektren bestätigte, dass das Signal  $m/z$  521,15  $[M+2H]^{2+}$  in beiden Proben durch das gleiche Peptid hervorgerufen wurde. Diese Beobachtung wurde durch das identische Retentionsverhalten der beiden Analyten bestätigt (Abbildung 5 C und D). Der Vergleich der MS-Spektren zeigte, dass es sich bei dem Signal  $m/z$  521,15  $[M+2H]^{2+}$  im MS-Spektrum der Kontrolle um das Signal mit der höchsten Signalintensität handelte (Abbildung 3 B). Im Vergleich hierzu zeigte das MS-Spektrum der ablatierten Probe neben dem Signal bei  $m/z$  521,15  $[M+2H]^{2+}$  ein weiteres Signal bei  $m/z$  788,97  $[M+3H]^{3+}$ . Das Signal  $m/z$  788,97  $[M+3H]^{3+}$  besaß eine geringfügig höhere Intensität als das Signal  $m/z$  521,15  $[M+2H]^{2+}$  (Abbildung 3 A). Bei dem Signal  $m/z$  788,97  $[M+3H]^{3+}$  handelt es sich um das tryptische RNase A-Peptid QHMDSSTSAASSSNYCNQMMK, welches im MS-Spektrum der Kontrolle ebenfalls vorhanden war (Abbildung 3 B). Das Signal  $m/z$  788,96  $[M+3H]^{3+}$  besaß im Fall der Kontrolle allerdings eine geringere Intensität als das Signal  $m/z$  521,15  $[M+2H]^{2+}$ . Der Vergleich der extrahierten Ionenchromatogramme (EICs) der Signale  $m/z$  521,15  $[M+2H]^{2+}$  und  $m/z$  788,96  $[M+3H]^{3+}$  zeigte, dass sich die Elutionsprofile der beiden Signale überlagerten (Abbildung 5).





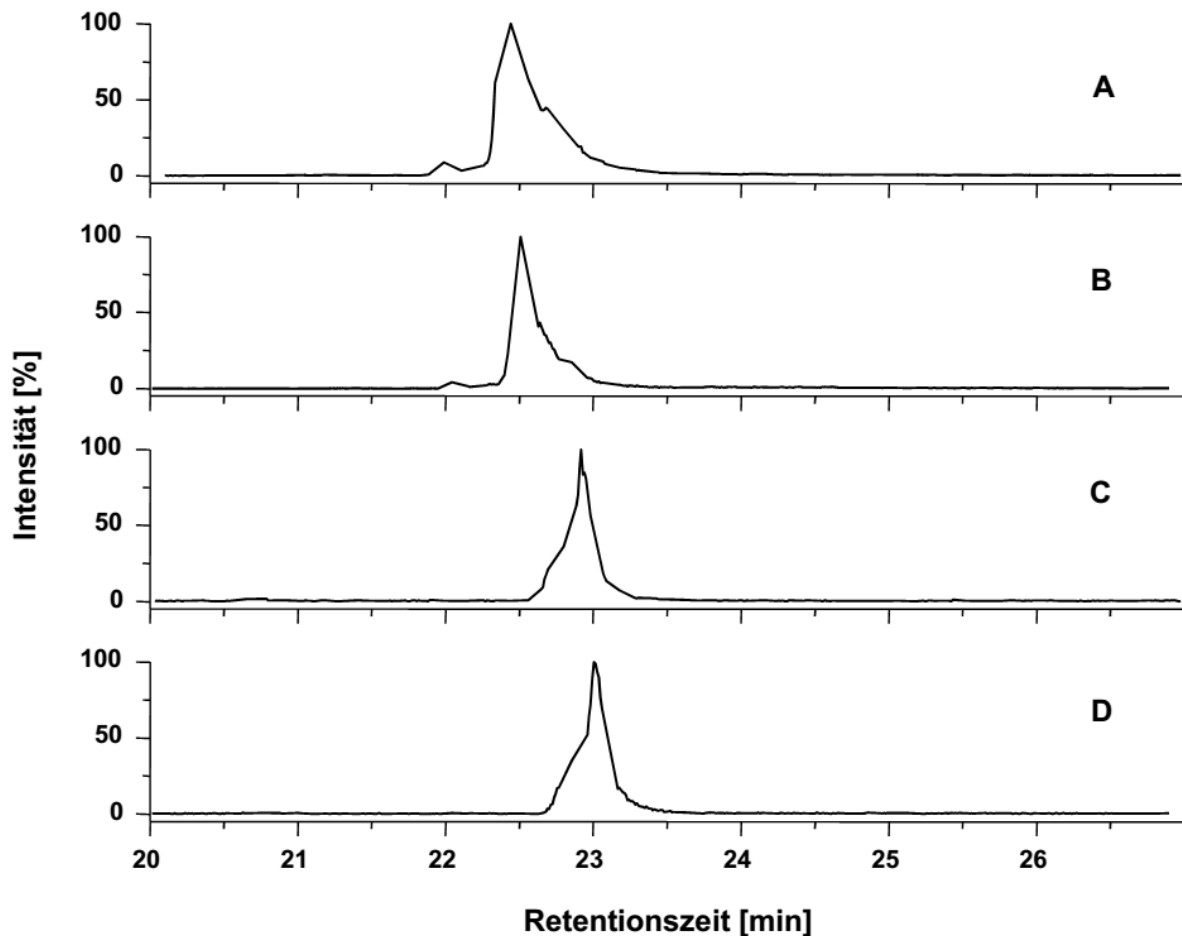
**Abbildung 3: Ausschnitte der MS-Spektren der LC-MS/MS-Analyse der tryptischen RNase A-Peptide zur RT 22,05 min (C, D) und 23,02 min (A, B) (Abbildung 2, \*1).** A: Ausschnitt des MS-Spektrum der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation zur RT 23,02 min. B: Ausschnitt des MS-Spektrum der LC-MS/MS-Analyse RNase A vor PIRL-Ablation zur RT 23,02 min. C: Ausschnitt des MS-Spektrum der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation zur RT 22,05 min. D: Ausschnitt des MS-Spektrum der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation zur RT 22,05 min. Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Masse-zu-Ladungsverhältnis [m/z].



**Abbildung 4: Fragmentspektren des Peptids QHMSSTSAASSNYCNQMMK (m/z 788,9 [M+3H]<sup>3+</sup>) in der LC-MS/MS-Analyse (Abbildung 2, \*1) der tryptischen RNase A-Peptide zur RT 22,05 min. A: Fragmentspektrum des Vorläuferions m/z 788,96 [M+3H]<sup>3+</sup> in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation. B: Fragmentspektrum des Vorläuferions m/z 788,95 [M+3H]<sup>3+</sup> in der LC-MS/MS-Analyse RNase A vor PIRL-Ablation. Die für die Identifizierung herangezogenen y-Ionen sind in den Spektren markiert. Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z).**

Des Weiteren zeigte der Vergleich der EICs, dass das Signal m/z 788,96 [M+3H]<sup>3+</sup> sowohl im Chromatogramm der RNase A nach PIRL-Ablation als auch im Chromatogramm der RNase A vor PIRL-Ablation für das abundante Signal bei RT 22,5 min verantwortlich war (Abbildung 1 und Abbildung 2). Da das Signal m/z 521,15 [M+2H]<sup>2+</sup> im Spektrum der RNase A vor PIRL-Ablation bei RT 23,02 min eine höhere Signalintensität besaß als das Signal m/z 788,96 [M+3H]<sup>3+</sup> (Abbildung 3 B), erschien es im Chromatogramm bei RT 23,02 min als Schulterpeak (Abbildung 1). Im Vergleich hierzu hatte das Signal m/z 788,97 [M+3]<sup>3+</sup> im Spektrum der RNase A nach PIRL-Ablation bei RT 23 min eine höhere Intensität als das Signal m/z 521,15 [M+2H]<sup>2+</sup> (Abbildung 3 A). Daher sah es in den einander gegenübergelegten Chromatogrammen (Abbildung 2) so aus, als wäre das Signal des Schulterpeaks (Abbildung 2,

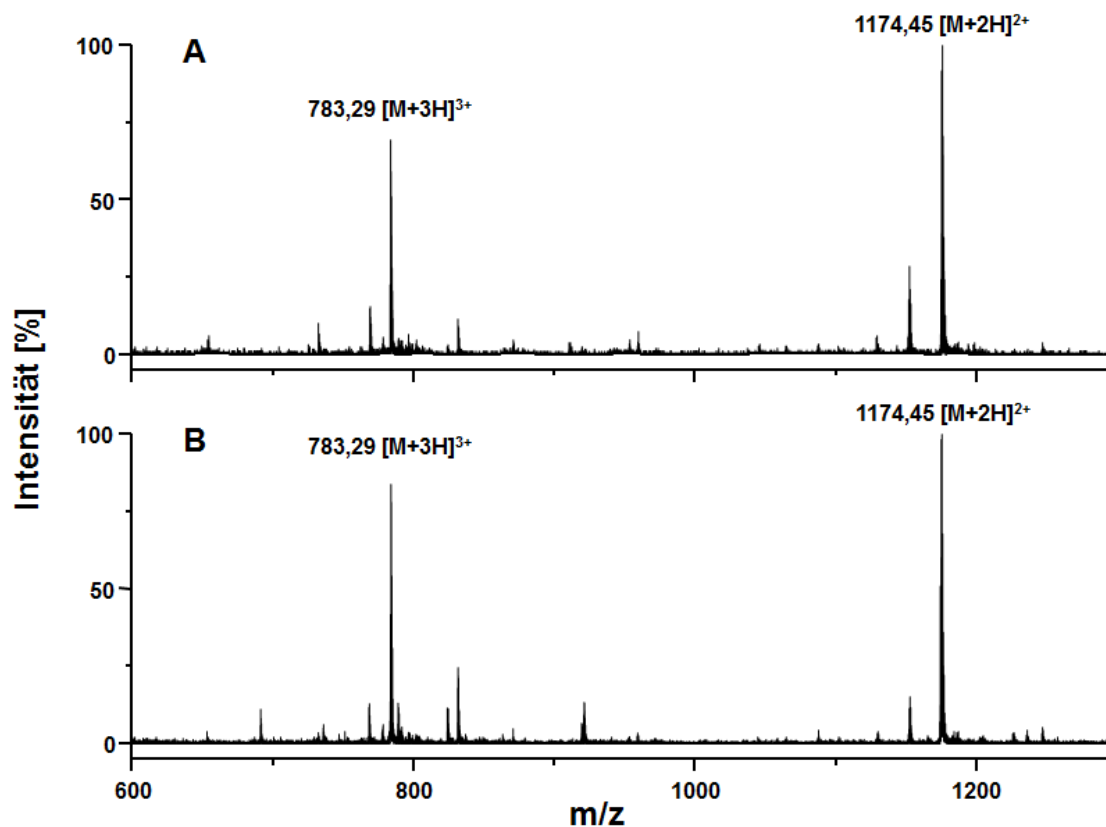
\*1) bei RT 23,02 min nur im Chromatogramm der RNase A vor der PIRL-Ablation vorhanden gewesen. Die manuelle Analyse der MS-Spektren sowie der EICs in Abbildung 5 zeigten jedoch, dass es sich bei dem in den Chromatogrammen beobachteten Unterschied um einen quantitativen und keinen qualitativen Unterschied handelte.



**Abbildung 5: Extrahierte-Ionenchromatogramme (EICs) verschiedener Peptide der LC-MS/MS-Analyse der tryptischen RNase A-Peptide (Abbildung 2, \*1).** A: EIC des Peptids QHMSDSSTAASSSNYCNQMMK ( $m/z$  788,96  $[M+3H]^{3+}$ ) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation. B: EIC des Peptids QHMSDSSTAASSSNYCNQMMK ( $m/z$  788,96  $[M+3H]^{3+}$ ) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation. C: EIC des Peptids mit  $m/z$  521,15  $[M+2H]^{2+}$  in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation. D: EIC des Peptids mit  $m/z$  521,15  $[M+2H]^{2+}$  in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation. Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Retentionszeit [min].

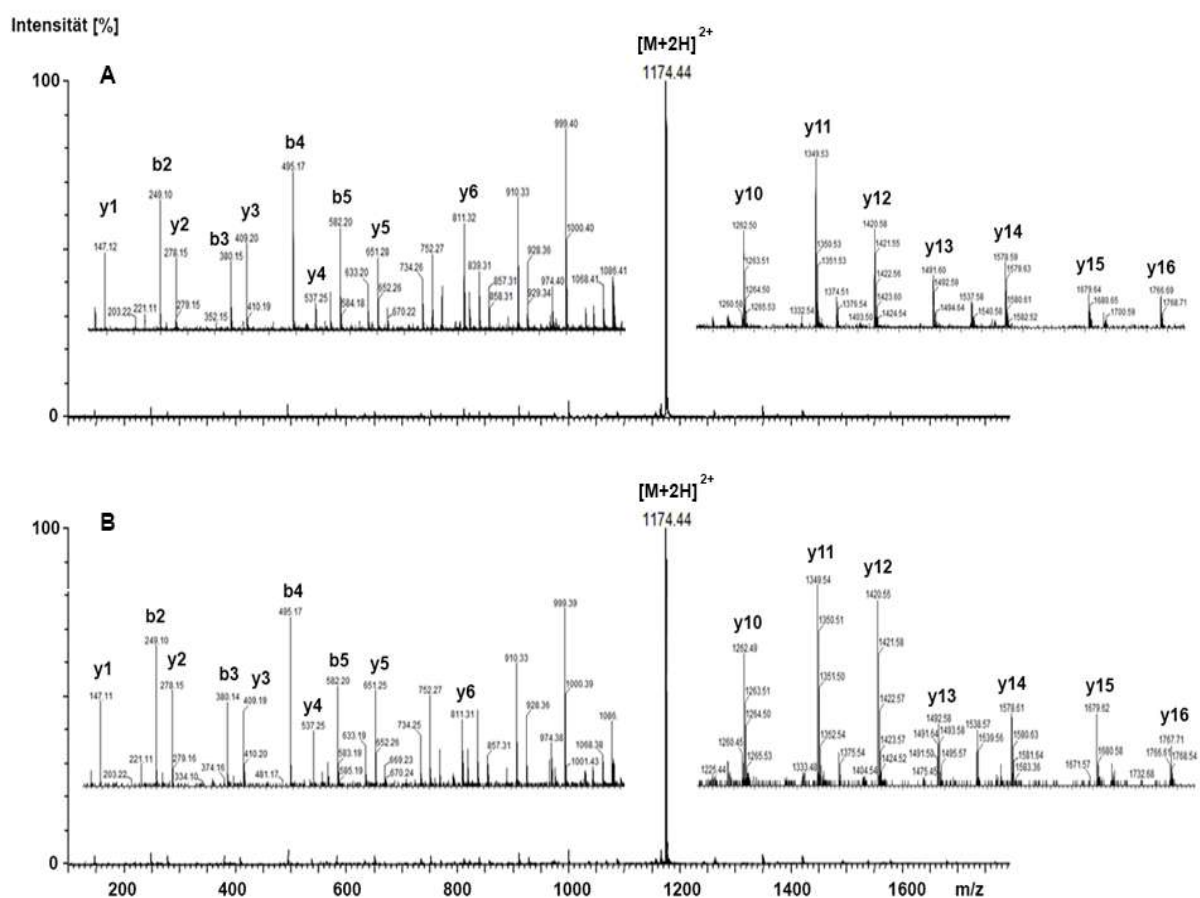
Das Chromatogramm der RNase A nach PIRL-Ablation zeigte zwei Signale (Abbildung 2, \*2, RT 23,89 min und \*3 RT 24,05 min), die im Chromatogramm der RNase A vor PIRL-Ablation nicht

detektiert werden konnten. Die Analyse der MS-Spektren zwischen RT 23,6 min und 24 min ergab, dass das Signal \*2 (Abbildung 2) durch zwei unterschiedliche Signale mit den  $m/z$ -Werten  $m/z$  1174,45  $[M+2H]^{2+}$  und  $m/z$  1174,92  $[M+2H]^{2+}$  hervorgerufen wurde (Abbildung 6 A und Abbildung 6 C). Die Fragmentspektren der beiden Vorläuferionen konnten in der Datenbanksuche nicht identifiziert werden. Die manuelle Analyse des Fragmentspektrums des Peptids mit  $m/z$  1174,45  $[M+2H]^{2+}$  ergab folgende Aminosäuresequenz: HMDSSTSAASSSNYCNQMMK (Abbildung 7). Die ermittelte Aminosäuresequenz wurde mit der Aminosäuresequenz der RNase A abgeglichen. Der Vergleich zeigte, dass die manuell bestimmte Sequenz mit dem tryptischen RNase A-Peptid QHMDSSTSAASSSNYCNQMMK teilweise übereinstimmte.



**Abbildung 6:** Ausschnitte der MS-Spektren der LC-MS/MS-Analyse der tryptischen RNase A-Peptide zur RT 23,89 min (A, B) und RT 23,92 min (C, D) (Abbildung 2, \*2). A: Ausschnitt des MS-Spektrums der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation zur RT 23,8 min. B: Ausschnitt des MS-Spektrums der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation zur RT 23,8 min. C: Ausschnitt des MS-Spektrums der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation zur RT 23,92 min. D: Ausschnitt des MS-Spektrums der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation zur RT 23,92 min. Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Masse-zu-Ladungsverhältnis  $[m/z]$ .

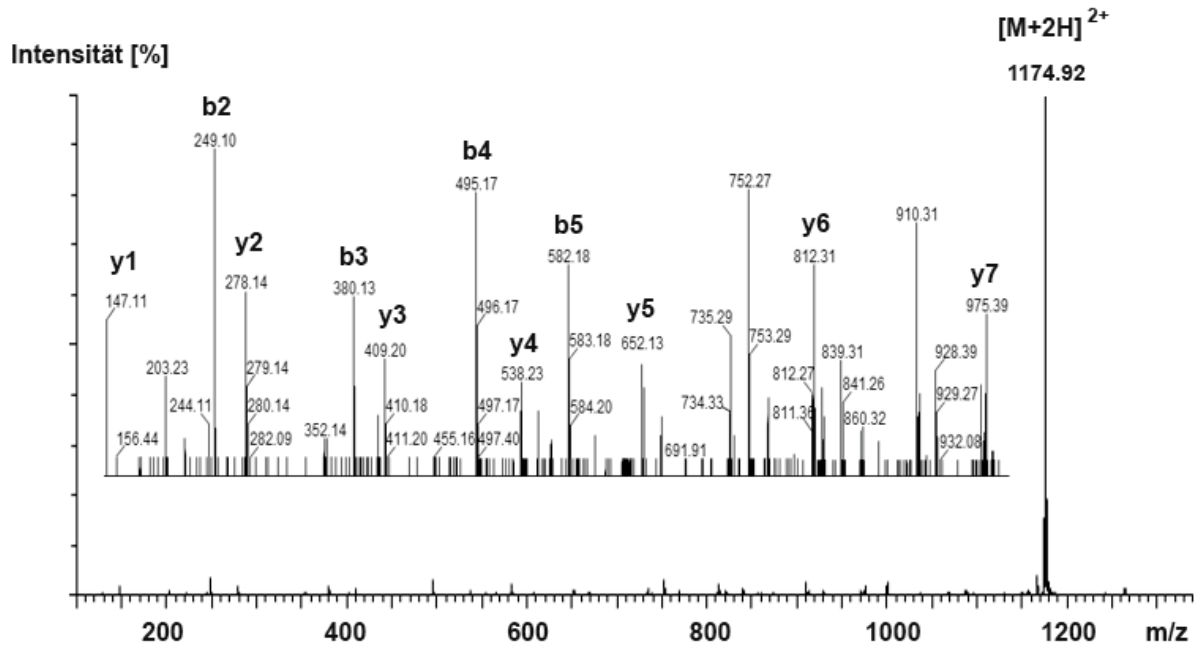
Die anhand des Vorläuferions ( $m/z$  1174,45  $[M+2H]^{2+}$ ) experimentell ermittelte Molekularmasse des Peptids ( $m=2346,9114$  Da) war 17,0125 Da kleiner als die theoretische Molekularmasse ( $m=2363,9239$  Da). Bei dem Signal  $m/z$  1174,45  $[M+2H]^{2+}$  musste es sich um eine modifizierte Spezies des RNase A-Peptides QHMSSTSAASSSNYCNQMMK handeln. Anhand der komplementären  $y$ - und  $b$ -Ionenserie wurde festgestellt, dass der modifizierte Aminosäurerest am N-Terminus des Peptids sitzen musste. Zusammen mit der Information über den Massenunterschied von -17,0125 Da musste das modifizierte Peptid am N-Terminus anstelle eines Glutamins ein pyro-Glutamat (Pyr) besitzen (PyrHMSSTSAASSSNYCNQMMK).



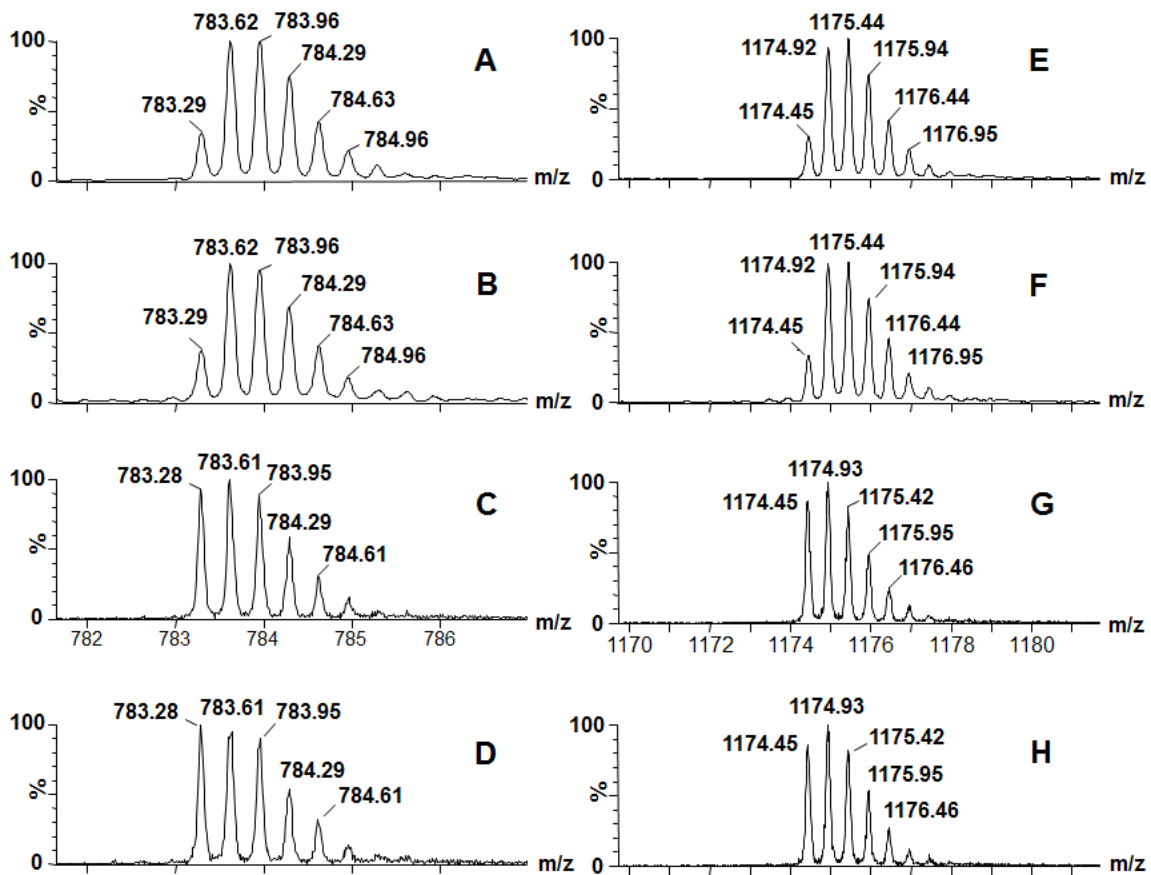
**Abbildung 7: Fragmentspektren des Peptids PyrHMSSTSAASSSNYCNQMMK ( $m/z$  1174,45  $[M+2H]^{2+}$ ) in der LC-MS/MS-Analyse der tryptischen RNase A-Peptide (RT 23,89 min, Abbildung 2, \*2).** A: Fragmentspektrum des Vorläuferions  $m/z$  1174,45  $[M+2H]^{2+}$  in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation. B: Fragmentspektrum des Vorläuferions  $m/z$  1174,45  $[M+2H]^{2+}$  in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation. Die für die Identifizierung herangezogenen  $y$ -Ionen und  $b$ -Ionen sowie das Vorläuferion sind in den Spektren markiert. Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ).

Das zweite Peptid, welches für das mit \*2 markierte Signal im Chromatogramm der RNase A nach PIRL-Ablation verantwortlich war (Abbildung 2), hatte einen m/z-Wert von m/z 1174,92 [M+2H]<sup>2+</sup> (Abbildung 6 B). Im Vergleich zu dem Peptid PyrHMDSSTSAASSSNYCNQMMK (m/z 1174,45 [M+2H]<sup>2+</sup>) lag ein Massenunterschied von +0,94 Da vor. Aufgrund des Masseninkrements wurde angenommen, dass es sich bei dem Peptide m/z 1174,92 [M+2H]<sup>2+</sup> um eine deamidierte Spezies des Peptids PyrHMDSSTSAASSSNYCNQMMK handelte. Durch eine Deamidierung würde ein theoretisches Masseninkrement von +0,984 Da entstehen. Der Vergleich der Isotopenverteilungen der zwei- und dreifach geladenen Signale zeigte, dass sich die Isotopenverteilungen der modifizierten und nicht-modifizierten Variante einander überlagerten (Abbildung 9 A, C, E und G). Aufgrund des Masseninkrements der deamidierten Spezies zeigten die Isotopensignale der Isotopenverteilungen in Abbildung 9 A und E eine geringfügige Verbreiterung und Verschiebung zu niedrigeren m/z-Werten verglichen mit der Isotopenverteilung der nicht modifizierten Spezies (Abbildung 9 C und Abbildung 9 G). Die manuelle Analyse des Fragmentspektrums des Vorläuferions m/z 1174,92 [M+2H]<sup>2+</sup> (Abbildung 8) ergab, dass statt des Asparaginrestes ein Aspartatrest vorlag, der durch eine Deamidierung entstanden sein musste (PyrHMDSSTSAASSSNYCDQMMK). Der deamidierte Asparaginrest konnte im Fragmentspektrum durch die Detektion des  $\gamma$ 5-Ions bei m/z 652 identifiziert werden. Um zu untersuchen, ob die Signale m/z 1174,45 [M+2H]<sup>2+</sup> (PyrHMDSSTSAASSSNYCNQMMK) und m/z 1174,92 [M+2H]<sup>2+</sup> (PyrHMDSSTSAASSSNYCDQMMK) tatsächlich nur in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation detektiert werden konnten, wurden die MS- und MS/MS-Spektren der entsprechenden RT-Bereiche der nicht-ablatierten RNase A manuell untersucht. Die MS-Spektren zwischen RT 23,6 min und 24 min zeigten, dass die Signale m/z 1174,45 [M+2H]<sup>2+</sup> und m/z 1174,92 [M+2H]<sup>2+</sup> in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation ebenfalls vorhanden waren (Abbildung 6 B und Abbildung 6 D). Die De-Novo-Sequenzierung des Fragmentspektrums des Vorläuferions m/z 1174,45 [M+2H]<sup>2+</sup> ergab ebenfalls die Peptidsequenz PyrHMDSSTSAASSSNYCDQMMK (Abbildung 7). Das Vorläuferion m/z 1174,92 [M+2H]<sup>2+</sup> wurde aufgrund einer zu niedrigen Signalintensität nicht zur Fragmentierung ausgewählt. Ein Vergleich der Isotopenverteilungen (Abbildung 9) deutete darauf hin, dass es sich bei dem Signal m/z 1174,92 [M+2H]<sup>2+</sup> ebenfalls um die deamidierte Peptidspezies PyrHMDSSTSAASSSNYCDQMMK handelte. Bestätigt wurde diese Vermutung durch einen Vergleich der Elutionsprofile für das Signal m/z 1174,92 [M+2H]<sup>2+</sup> in der LC-MS/MS-Analyse

der ablatierten und nicht-ablatierten Probe (Abbildung 10). Beide Chromatogramme zeigten ein identisches Retentionsverhalten.

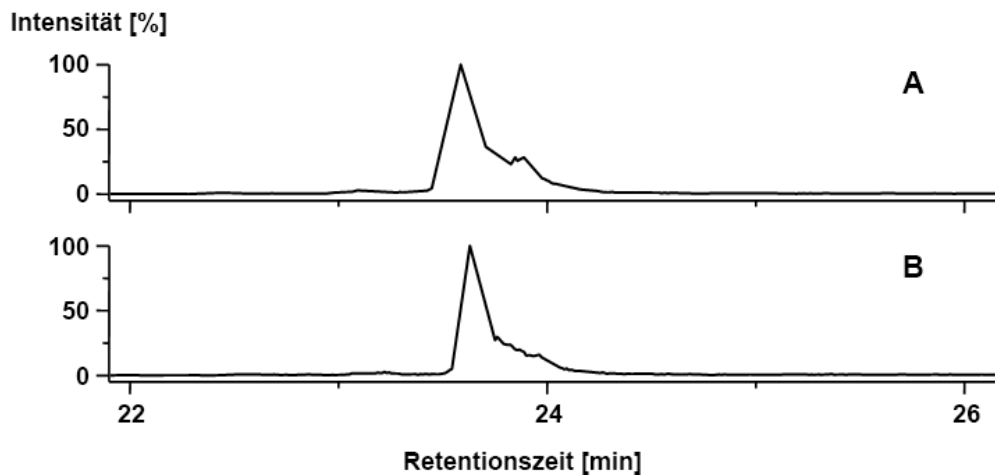


**Abbildung 8: Fragmentspektrum des Peptids PyrHMDsSTSAASSNYCDQMMK ( $m/z$  1174,92  $[M+2H]^{2+}$ ) in der LC-MS/MS-Analyse der tryptischen RNase A-Peptide (RT 23,92 min, Abbildung 2, \*2). Fragmentspektrum des Vorläuferions  $m/z$  1174,45  $[M+2H]^{2+}$  in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation. Die für die Identifizierung herangezogenen y-Ionen und b-Ionen sowie das Vorläuferion sind in den Spektren markiert. Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ).**



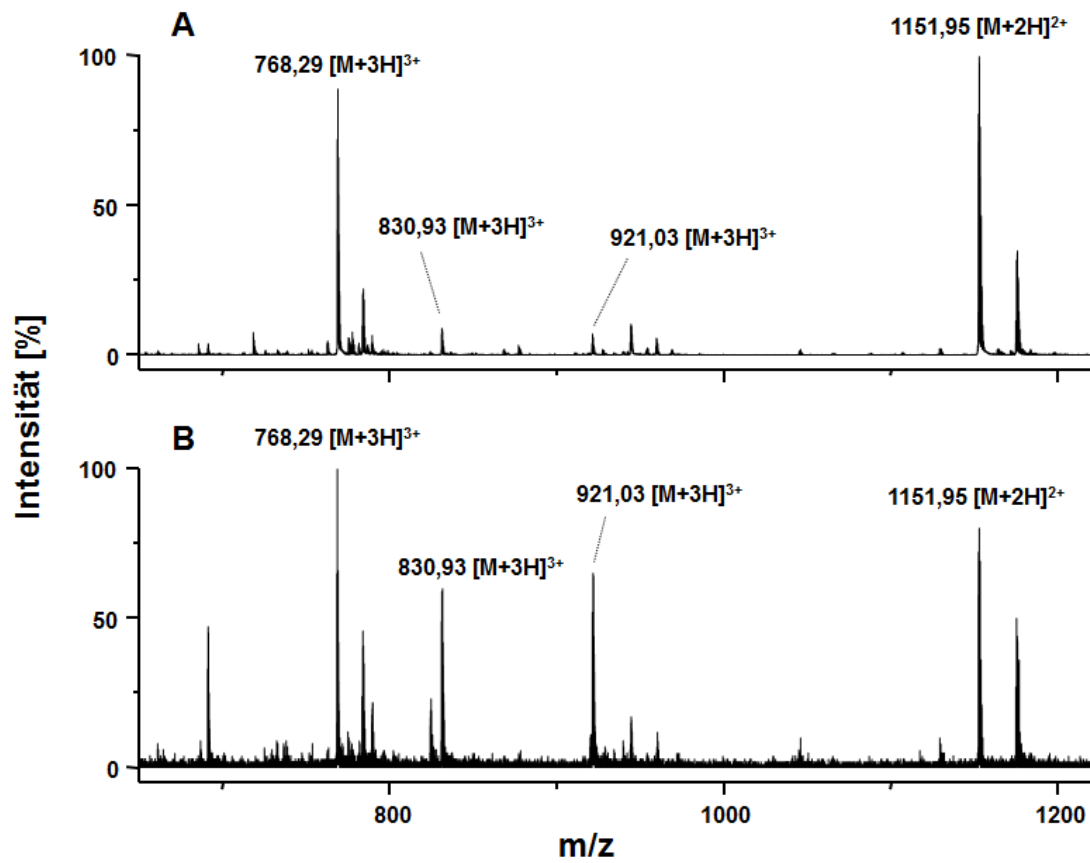
**Abbildung 9: Isotopenverteilungen der deamidierten (RT 23,8 min, A, B, E, F) und der nicht-deamidierten (RT 23,92 min, C, D, G, H) Variante des Peptids PyrHMSSTSAASSNYC(D/N)QMMK in der LC-MS/MS-Analyse der tryptischen RNase A-Peptide.** A: Isotopenverteilung der deamidierten Peptidspezies PyrHMSSTSAASSNYCDQMMK ( $m/z$  783,62  $[M+3H]^{3+}$ ) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation. B: Isotopenverteilung der deamidierten Peptidspezies PyrHMSSTSAASSNYCDQMMK ( $m/z$  783,62  $[M+3H]^{3+}$ ) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation. C: Isotopenverteilung der nicht-deamidierten Peptidspezies PyrHMSSTSAASSNYCNQMMK ( $m/z$  783,28  $[M+3H]^{3+}$ ) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation. D: Isotopenverteilung der nicht-deamidierten Peptidspezies PyrHMSSTSAASSNYCNQMMK ( $m/z$  783,28  $[M+3H]^{3+}$ ) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation. E: Isotopenverteilung der deamidierten Peptidspezies PyrHMSSTSAASSNYCDQMMK ( $m/z$  1174,92  $[M+2H]^{2+}$ ) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation. F: Isotopenverteilung der deamidierten Peptidspezies PyrHMSSTSAASSNYCDQMMK ( $m/z$  1174,92  $[M+2H]^{2+}$ ) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation. G: Isotopenverteilung der nicht-deamidierten Peptidspezies PyrHMSSTSAASSNYCNQMMK ( $m/z$  1174,45  $[M+2H]^{2+}$ ) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation. H: Isotopenverteilung der nicht-deamidierten Peptidspezies PyrHMSSTSAASSNYCNQMMK ( $m/z$  1174,45  $[M+2H]^{2+}$ ) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation. Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ).



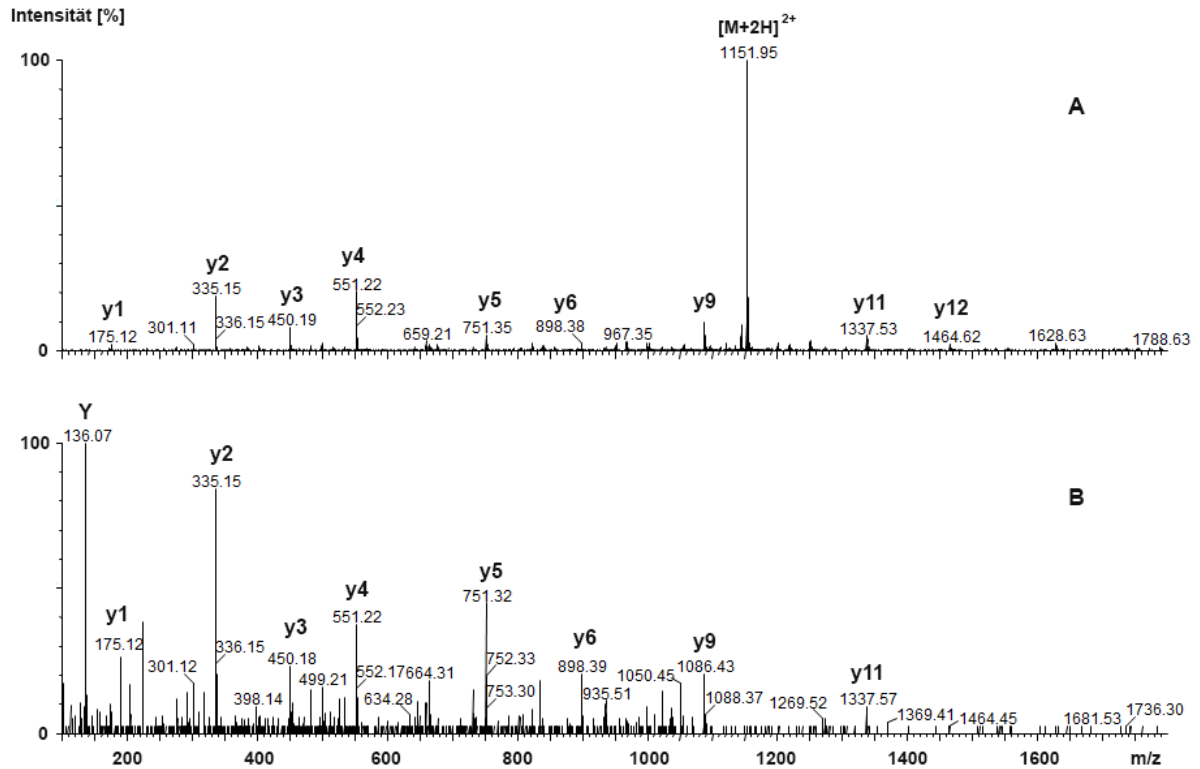


**Abbildung 10: Extrahierte Ionenchromatogramme (EICs) für das Signal  $m/z$  1074,92  $[M+2]^{2+}$  in der LC-MS/MS-Analyse der tryptischen RNase A-Peptide.** A: EIC für das Signal  $m/z$  1074,92  $[M+2H]^{2+}$  in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation. B: EIC für das Signal  $m/z$  1074,92  $[M+2H]^{2+}$  in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation. Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Retentionszeit [min].

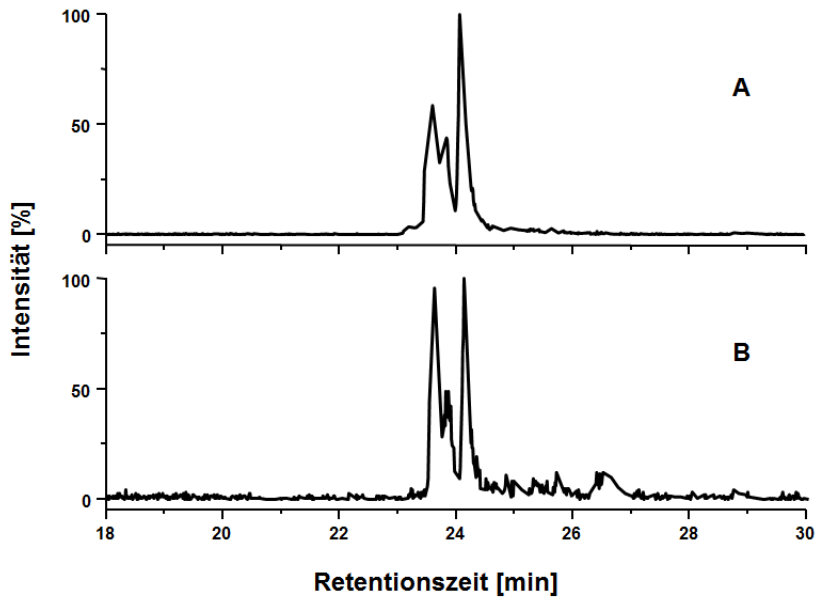
Das zweite Signal (Abbildung 2, \*3), welches nur im Chromatogramm der RNase A nach PIRL-Ablation identifiziert wurde, wurde durch ein zweifach geladenes Signal mit dem  $m/z$ -Wert 1151,95  $[M+2H]^{2+}$  hervorgerufen (Abbildung 11 A). Die Analyse der MS-Spektren des entsprechenden RT-Bereichs der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation zeigte, dass dieses Signal ebenfalls vorhanden war (Abbildung 11 B). Das Signal konnte in der Datenbanksuche weder in der ablatierten noch in der nicht-ablatierten Probe identifiziert werden. Die manuelle Analyse der Fragmentspektren ergab eine Identifizierung des RNase A-Peptids DGQTNCYQSYSTEM(ox.)SITDCR (Abbildung 12). Bei diesem Peptid handelte es sich um die deamidierte und oxidierte Variante des tryptischen RNase A-Peptids NGQTNCYQSYSTEMSITDCR. Die b-Ionenserie der Fragmentspektren zeigte, dass der N-Terminus deamidiert vorlag und anhand des beobachteten Neutralverlustes der Methansulfensäure ( $\text{CH}_3\text{SOH}$ ) von 64 Da in der  $\gamma$ -Ionenserie konnte festgestellt werden, dass der Methioninrest oxidiert als Methioninsulfoxid vorlag. Darüber hinaus zeigten die EICs für das Signal  $m/z$  1151,96  $[M+2H]^{2+}$  sowohl für die RNase A nach PIRL-Ablation als auch für die RNase A vor PIRL-Ablation ein identisches Elutionsprofil (Abbildung 13).



**Abbildung 11: Ausschnitte der MS-Spektren der LC-MS/MS-Analyse der tryptischen RNase A-Peptide) zur RT 24,1 min (Abbildung 2, \*3).** A: Ausschnitt des MS-Spektrums der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation. B: Ausschnitt des MS-Spektrums der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation. Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Masse-zu-Ladungsverhältnis [m/z].



**Abbildung 12: Fragmentspektren des Peptids DGQTNCYQSYSTM(ox.)SITDCR in der LC-MS/MS-Analyse der tryptischen RNase A-Peptide (RT 24,1 min, Abbildung 2, \*3).** A: Fragmentspektrum des Vorläuferions m/z 1151,95 [M+2H]<sup>2+</sup> in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation. B: Fragmentspektrum des Vorläuferions m/z 768,3 [M+3H]<sup>3+</sup> in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation. Die für die Identifizierung herangezogenen y-Ionen sowie das Vorläuferion sind in den Spektren markiert. Y: Tyrosin-Immoniumion. Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z).



**Abbildung 13: Extrahierte Ionenchromatogramme für das Signal  $m/z$  1151,95  $[M+2]^{2+}$  in der LC-MS/MS-Analyse der tryptischen RNase A-Peptide** A: EIC für das Signal  $m/z$  1151,95  $[M+2H]^{2+}$  in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation. B: EIC für das Signal  $m/z$  1151,95  $[M+2H]^{2+}$  in der LC-MS/MS-Analyse RNase A vor PIRL-Ablation. Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Retentionszeit [min].

### 7.1.1.2 Identifizierung der tryptischen Peptide via Datenbanksuche

Für die Identifizierung der tryptischen RNase A-Peptide wurden die Fragmentspektren der LC-MS/MS-Analysen als Peaklisten im \*.mzML-Format exportiert. Die Identifizierung erfolgte mit der Mascot-Suchmaschine. Bei der Identifizierung der tryptischen Peptide wurden folgende Aminosäuremodifizierungen berücksichtigt: eine Carbamidomethylierung am Cystein (statische Modifizierung) und eine Oxidation am Methionin (variable Modifizierung). In der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation wurden zehn verschiedene tryptische RNase A-Peptide identifiziert (Tabelle 1). Die identifizierten Peptide resultierten in einer Sequenzabdeckung von 81% für die RNase A (ohne Signalpeptid).

Sequenzabdeckung der RNase A nach PIRL-Ablation (ohne Signalpeptid; die identifizierte Aminosäuren sind fett gedruckt und unterstrichen dargestellt):

KETAAAKFER**QH****MDS****STSA****ASSS****NYCN****QMMK**SRNLTKDR**CK****PVNT****FVHES****LADV****QAVCS****QK**NVACK  
**NGQT****NCYQ****SYST****MSIT****DCRET****GSSK****YPNC****AYKTT****QANK****HIIV****ACEG****NPYP****VPVH****FDASV**

**Tabelle 1: Mascot-Identifizierung der RNase A nach PIRL-Ablation. M: oxidiertes Methioninrest.**

Peptid	p-Wert	Mascot-lonscore	$\Delta M$ [ppm]	m/z	z
ETGSSKYPNCAYK	1,5e-06	74	1,25	752,8414	2
HIIVACEGNPYVPVHFDASV	0,0035	44	-7,31	1112,5383	2
HIIVACEGNPYVPVHFDASV	0,026	35	-4,82	742,0298	3
NGQTNCYQSYSTMSITDCR	9,2e-07	68	-5,93	762,6410	3
NGQTNCYQSYSTMSITDCR	7,7e-08	80	3,73	1143,4689	2
NGQTNCYQSYSTMSITDCR	1,8e-06	67	3,82	1143,4690	2
NGQTNCYQSYSTMSITDCR	2,7e-07	71	-9,07	767,9702	3
NGQTNCYQSYSTMSITDCR	1,7e-09	96	3,05	1151,4656	2
QHMDSSSTAASSSNYCNQMMK	8,7e-05	46	0,67	1182,9700	2
QHMDSSSTAASSSNYCNQMMK	6,1e-09	85	-10,89	794,3049	3
QHMDSSSTAASSSNYCNQMMK	4,1e-09	88	-7,99	794,3072	3
QHMDSSSTAASSSNYCNQMMK	0,00037	39	-5,23	799,6410	3
CKPVNTFVHESLADVQAVCSQK	2,2e-05	65	-9,63	839,7376	3
CKPVNTFVHESLADVQAVCSQK	0,022	36	3,60	1259,1194	2
TTQANKHIIVACEGNPYVPVHFDASV	0,0043	42	-11,98	717,6005	4
TTQANKHIIVACEGNPYVPVHFDASV	0,0012	48	-1,62	956,4748	3

In der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation konnten insgesamt sechs verschiedene tryptische RNase A-Peptide identifiziert werden (Tabelle 2). Wie bei der ablatierten RNase A wurde eine Sequenzabdeckung von 81% erreicht. Ein Vergleich der Sequenzabdeckungen zeigte, dass sowohl in der ablatierten als auch in der nicht-ablatierten RNase A die gleichen Aminosäuren identifiziert werden konnten.

Sequenzabdeckung der RNase A vor PIRL-Ablation (ohne Signalpeptid, identifizierte Aminosäuren sind fett gedruckt und unterstrichen dargestellt):

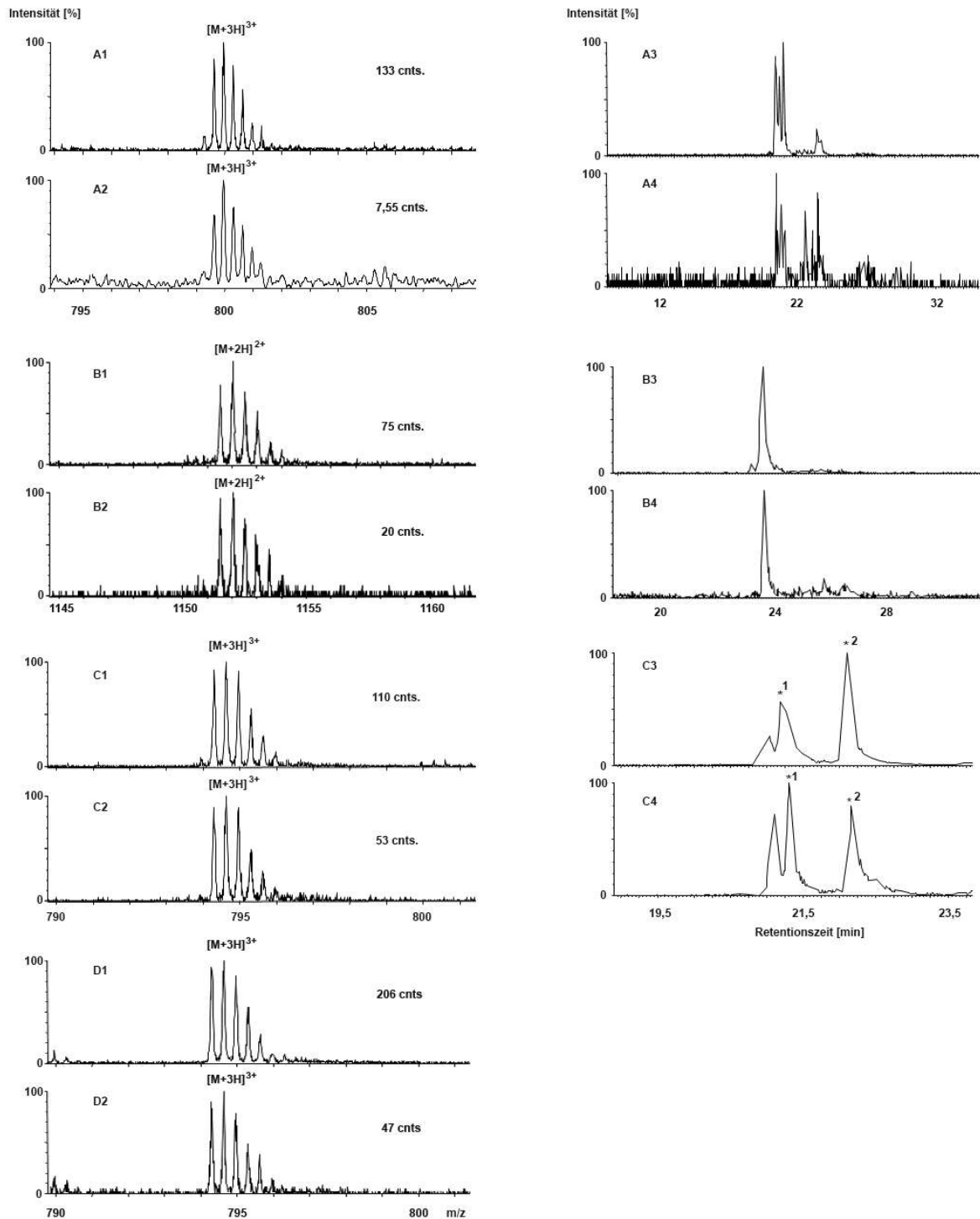
KETAAAKFER**QHMDSSSTAASSSNYCNQMMK**SRNLTKDR**CKPVNTFVHESLADVQAVCSQK**INVACK  
**NGQTNCYQSYSTMSITDCRETGSSKYPNCAYKTTQANKHIIVACEGNPYVPVHFDASV**

**Tabelle 2: Mascot-Identifizierung der RNase A vor PIRL-Ablation. M: oxidiertes Methioninrest.**

Peptid	p-Wert	Mascot-Ionscore	$\Delta M$ [ppm]	m/z	z
ETGSSKYPNCAYK	9,5e-06	66	3,65	752,8432	2
HIIVACEGNPYVPVHFDASV	0,0025	45	-9,28	742,0265	3
HIIVACEGNPYVPVHFDASV	0,0019	47	2,14	1112,5488	2
NGQTNCYQSYSTMSITDCR	2e-07	74	-6,32	762,6407	3
NGQTNCYQSYSTMSITDCR	1,9e-11	116	2,42	1143,4674	2
QHMDSSSTAASSSNYCNQMMK	9,5e-09	88	7,86	1182,9785	2
CKPVNTFVHESLADVQAVCSQK	5,7e-05	61	-7,48	839,7394	3
TTQANKHIIVACEGNPYVPVHFDASV	0,0074	40	-5,81	956,4708	3

Die vier Peptide, die bei der Datenbanksuche ausschließlich in der LC-MS/MS-Analyse der Probe nach PIRL-Ablation identifiziert wurden, besaßen einen bzw. zwei oxidierte Methioninreste. Die Identifizierung der modifizierten Peptide resultierte in keiner zusätzlichen Sequenzabdeckung für die RNase A, da sowohl in der ablatierten als auch in der nicht-ablatierten Probe die entsprechenden nicht modifizierten Peptide identifiziert werden konnten. Um zu überprüfen, ob die modifizierten Peptide ausschließlich in der ablatierten Probe vorhanden waren, wurden die MS-Spektren der entsprechenden RT-Bereiche der nicht-ablatierten Probe manuell analysiert. Das zweifach oxidierte Peptid QHMDSSSTAASSSNYCNQM(ox.)M(ox.)K ( $m/z$  799,64,  $[M+3H]^{3+}$ ) eluierte in der LC-MS/MS-Analyse der ablatierten Probe zwischen RT 20,2 min und RT 20,5 min (Abbildung 14 A1 und Abbildung 14 A3). In den MS-Spektren des entsprechenden RT-Bereichs der nicht-ablatierten Probe konnte ein dreifach geladenes Ion mit einem  $m/z$ -Werte  $m/z$  799,62  $[M+3H]^{3+}$  detektiert werden (Abbildung 14 A2). Aufgrund der zu geringen Signalintensität für das Ion  $m/z$  799,62  $[M+3H]^{3+}$  wurde kein Fragmentspektrum aufgenommen. Der Vergleich der EICs (Ablation:  $m/z$  799,64;  $[M+3H]^{3+}$ , QHMDSSSTAASSSNYCNQM(ox.)M(ox.)K; Kontrolle:  $m/z$  799,62;  $[M+3H]^{3+}$ ) ergab für beide Signale ein identisches Retentionsverhalten (Abbildung 14 A3 und Abbildung 14 A4). Aufgrund des identischen Retentionsverhaltens und des detektierten  $m/z$ -Wertes konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Signal  $m/z$  799,62  $[M+3H]^{3+}$  in der Probe ebenfalls um das zweifach oxidierte Peptid QHMDSSSTAASSSNYCNQM(ox.)M(ox.)K handelte.

Die gleichen Resultate ergaben sich für die einfach oxidierten Peptide NGQTNCYQSYSTEM(ox.)SITDCR ( $m/z$  1151,46;  $[M+2H]^{2+}$ , RT 23,59 min, Abbildung 14 B1 bis Abbildung 14 B4), QHMDSSTSAASSSNYCNQM(ox.)MK ( $m/z$  794,30;  $[M+3H]^{3+}$ , RT 21,29 min, Abbildung 14 C1 bis Abbildung 14 C4) und QHM(ox.)DSSTSAASSSNYCNQMMK ( $m/z$  794,29;  $[M+3H]^3$ , 22,1 min, Abbildung 14 D1 und Abbildung 14 D2, Abbildung 14 C3 und Abbildung 14 C4). Die MS-Spektren der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation zeigten zur RT 23,63 min ein Signal bei  $m/z$  1151,43  $[M+2H]^{2+}$  (Abbildung 14 B2), bei RT 21,3 ein Signal bei  $m/z$  794,28  $[M+3H]^{3+}$  (Abbildung 14 C2) und bei RT 22,16 min ein Signal bei  $m/z$  794,28  $[M+3H]^{3+}$  (Abbildung 14 D2). Von keinem der Signale wurde ein Fragmentspektrum aufgenommen, da die Signalintensitäten auf der MS-Ebene zu niedrig waren, um vom DDA-Algorithmus (Datenabhängiger Aufnahmemodus; engl.: data dependant aquisition) für eine Fragmentanalyse ausgewählt zu werden. Um festzustellen, ob es sich bei den Signalen in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor und nach PIRL-Ablation um identische Peptidspezies handelte, wurden EICs erstellt (Abbildung 14 B4 und Abbildung 14 C4) Ein Vergleich der EICs zeigte für die Signale vor und nach PIRL-Ablation jeweils ein identischen Retentionsverhalten. Anhand der identischen EICs und der detektierten  $m/z$ -Werte konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Signalen  $m/z$  1151,46  $[M+2H]^2$  bei RT 23,63 min,  $m/z$  794,28  $[M+3H]^{3+}$  bei RT 21,3 min und  $m/z$  794,28  $[M+3H]^{3+}$  bei RT 22,16 min in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation um die einfach oxidierten Peptide NGQTNCYQSYSTEM(ox.)SITDCR, QHMDSSTSAASSSNYCNQM(ox.)MK und QHM(ox.)DSSTSAASSSNYCNQMMK handelte.



**Abbildung 14: Ausschnitte der MS-Spektren und die extrahierten Ionenchromatogramme der Methioninsulfoxid-haltigen Peptide der LC-MS/MS-Analyse der tryptischen RNase A-Peptide vor und nach PIRL-Ablation.** A1: Ausschnitt des MS-Spektrums des Peptids QHMDSTSASSNYCNQM(ox.)M(ox.)K ( $m/z$  799,64;  $[M+3H]^{3+}$ , RT 20,2-20,5 min) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation. A2: Ausschnitt des MS-Spektrums des Peptids QHMDSTSASSNYCNQM(ox.)M(ox.)K ( $m/z$  799,62;  $[M+3H]^{3+}$ , RT 20,2 - 20,5 min) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation. A3: Extrahiertes Ionenchromatogramm für das Signal  $m/z$  799,64  $[M+3H]^{3+}$  (QHMDSTSASSNYCNQM(ox.)M(ox.)K) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach



PIRL-Ablation. A4: Extrahiertes Ionenchromatogramm für das Signal  $m/z$  799,62  $[M+3H]^{3+}$  (QHMSSTSAASSSNYCNQM(ox.)M(ox.)K) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation. B1: Ausschnitt des MS-Spektrums des Peptids NGQTNCYQSYSTEM(ox.)SITDCR ( $m/z$  1151,46;  $[M+2H]^{2+}$ , RT 23,59 min) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation. B2: Ausschnitt des MS-Spektrums des Peptids NGQTNCYQSYSTEM(ox.)SITDCR ( $m/z$  1151,43;  $[M+2H]^{2+}$ , RT 23,63 min) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation. B3: Extrahiertes Ionenchromatogramm für das Signal  $m/z$  1151,46  $[M+2H]^{2+}$  (NGQTNCYQSYSTEM(ox.)SITDCR) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation. B4: Extrahiertes Ionenchromatogramm für das Signal  $m/z$  1151,43  $[M+2H]^{2+}$  (NGQTNCYQSYSTEM(ox.)SITDCR) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation. C1: Ausschnitt des MS-Spektrums des Peptids QHMSSTSAASSSNYCNQM(ox.)MK ( $m/z$  794,30;  $[M+3H]^{3+}$ , RT 21,29 min) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation. C2: Ausschnitt des MS-Spektrums des Peptids QHMSSTSAASSSNYCNQM(ox.)MK ( $m/z$  794,28;  $[M+3H]^{3+}$ , RT 21,3 min) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation. C3: Extrahiertes Ionenchromatogramm für das Signal  $m/z$  794,30;  $[M+3H]^{3+}$  (\*1: QHMSSTSAASSSNYCNQM(ox.)MK, \*2: QHM(ox.)DSSTSAASSSNYCNQMMK) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation. C4: Extrahiertes Ionenchromatogramm für das Signal  $m/z$  794,28;  $[M+3H]^{3+}$  (\*1: QHMSSTSAASSSNYCNQM(ox.)MK, \*2: QHM(ox.)DSSTSAASSSNYCNQMMK) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation. D1: Ausschnitt des MS-Spektrums des Peptids QHM(ox.)DSSTSAASSSNYCNQMMK ( $m/z$  794,30;  $[M+3H]^{3+}$ , RT 22,1 min) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation. Das extrahierte Ionenchromatogramm ist in C3 mit \*2 markiert. D2: Ausschnitt des MS-Spektrums des Peptids QHM(ox.)DSSTSAASSSNYCNQMMK ( $m/z$  794,28;  $[M+3H]^{3+}$ , RT 22,16 min) in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation. Das extrahierte Ionenchromatogramm ist in C4 mit \*2 markiert. cnts.: Counts. Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Masse-zu-Ladungsverhältnis  $[m/z]$  bzw. Retentionszeit [min].

### 7.1.1.3 Identifizierungsunabhängiger Vergleich der LC-MS/MS-Analysen

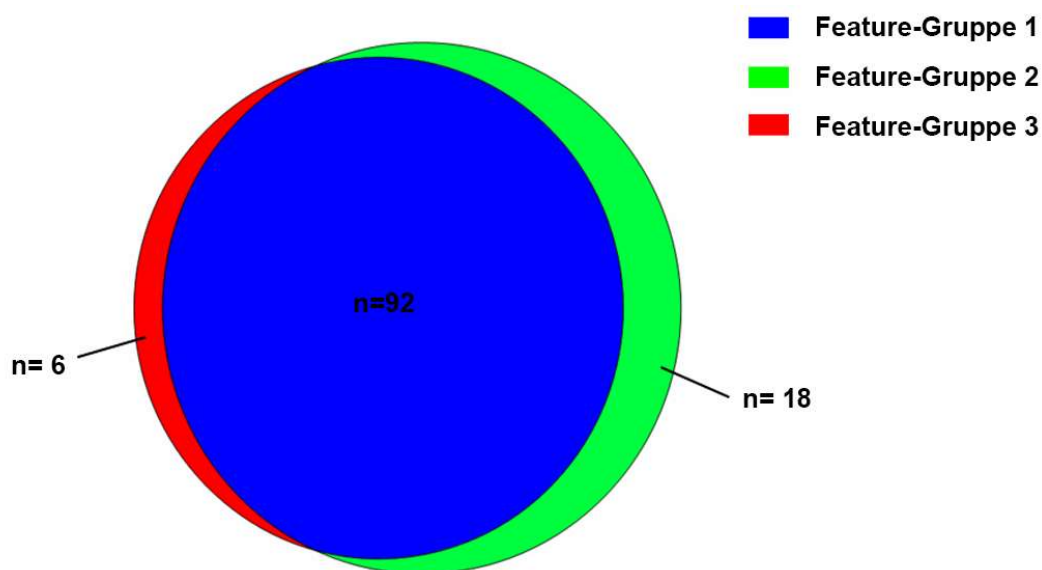
Neben der identifizierungsbasierten Datenbankanalyse (siehe Abschnitt 7.1.1.2) wurden die Datensätze mit dem OpenMS-System bioinformatisch analysiert. Hierfür wurde eine Prozessierungskette erstellt (Abbildung 42), die es ermöglichte, die Datensätze der LC-MS/MS-Analysen auf der MS-Ebene unabhängig von einer Identifizierung der Fragmentspektren zu vergleichen. Durch den FeatureFinder-Knoten wurden für die Datensätze auf der MS-Ebene sogenannte Features detektiert. Bei einem Feature handelte es sich um ein dreidimensionales Signal. Das dreidimensionale Signal bestand aus einem definierten  $m/z$ -Wert, einer definierten RT und einer definierten Signalintensität. Durch den FeatureLinker-Knoten wurden die detektierten Features der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor und nach PIRL-Ablation einander zugeordnet. Es entstanden durch die OpenMS-Prozessierungskette dementsprechend drei unterschiedliche Feature-Gruppen.

Feature-Gruppe 1: Features, die in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor und nach PIRL-Ablation detektiert werden konnten.

Feature-Gruppe 2: Features, die ausschließlich in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation detektiert werden konnten.

Feature-Gruppe 3: Features, die ausschließlich in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation detektiert werden konnten.

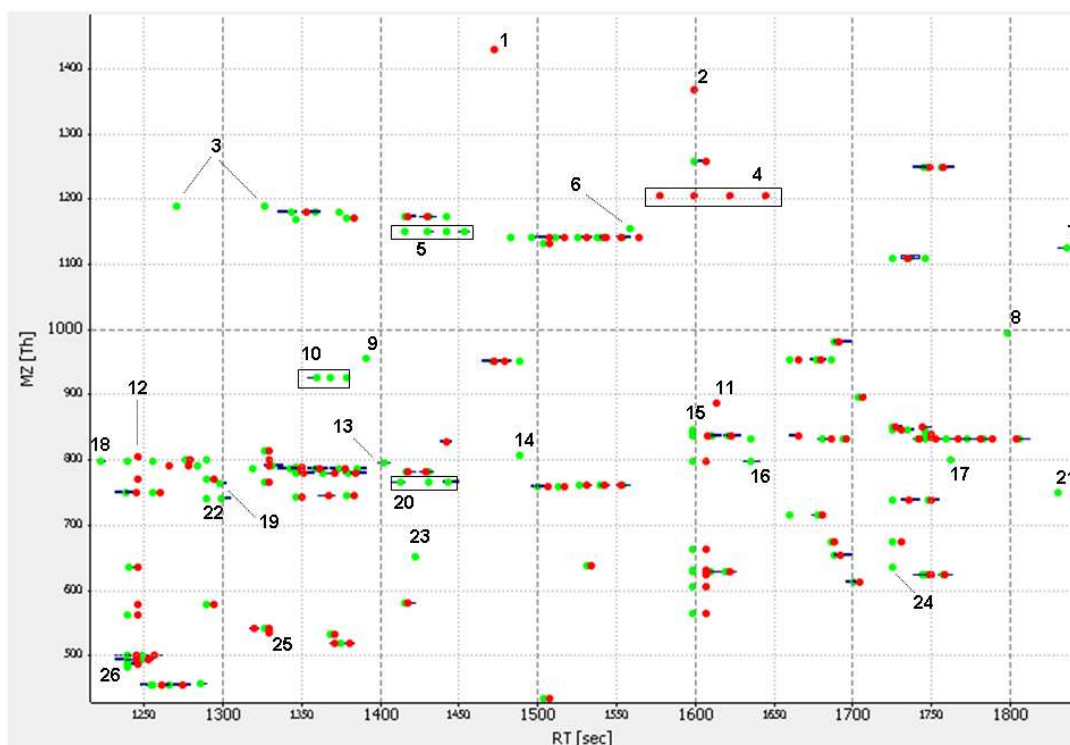
Insgesamt wurden mit der OpenMS-Prozessierungskette 116 Features detektiert. Von den 116 Features konnten 92 Features sowohl in der LC-MS/MS-Analyse vor als auch in der LC-MS/MS-Analyse nach PIRL-Ablation detektiert werden (Feature-Gruppe 1, Abbildung 15). Insgesamt 18 Features wurden ausschließlich in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation (Gruppe 2, Abbildung 15) und 6 Features wurden ausschließlich in der LC-MS/MS-Analyse vor PIRL-Ablation detektiert (Gruppe 3, Abbildung 15).



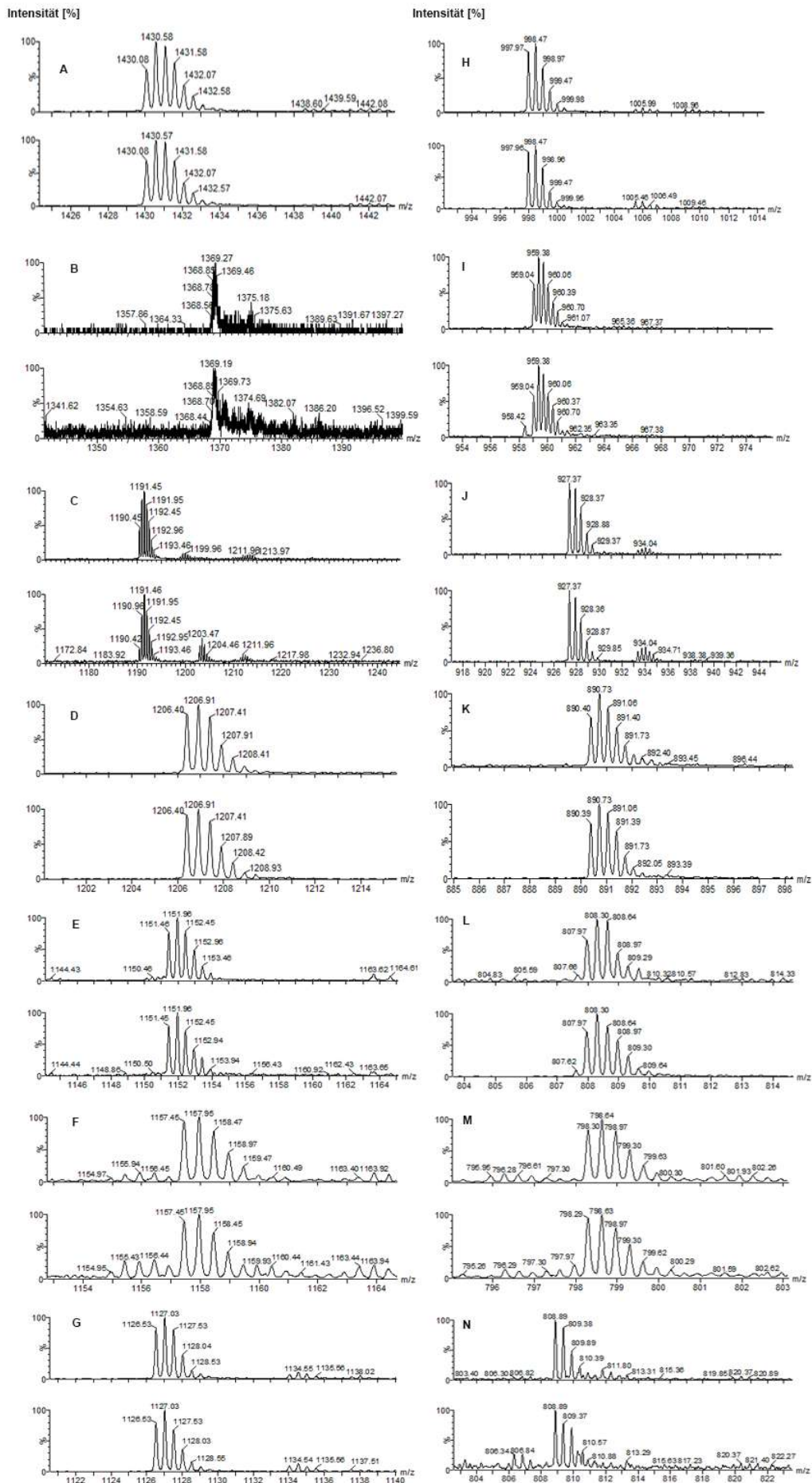
**Abbildung 15: Graphische Darstellung der Verteilung der Features der Identifizierungsunabhängigen Analyse.**

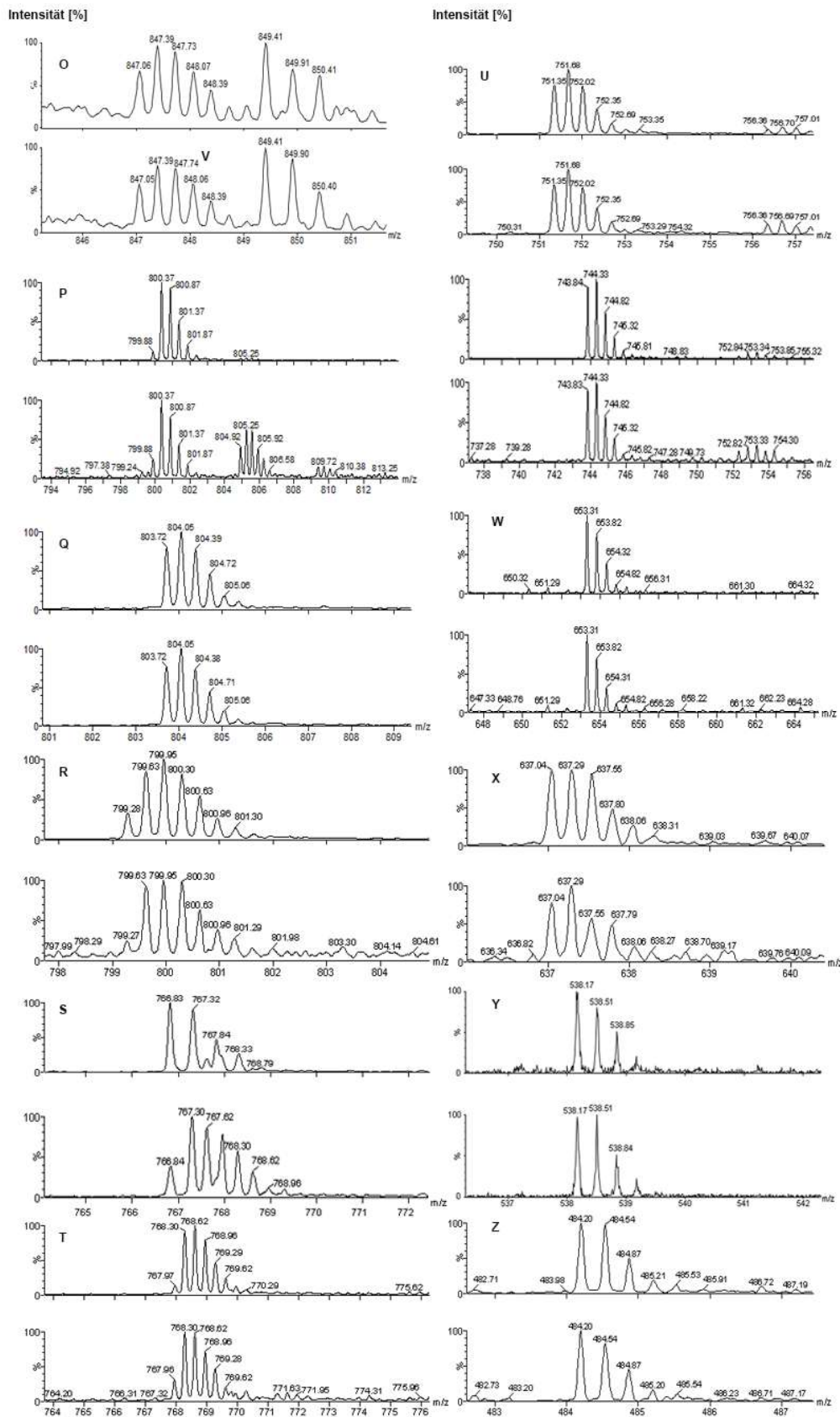
n: Anzahl der detektierten Features. Blau/Gruppe 1: Features, die in der LC-MS/MS-Analyse der tryptischen Peptide der RNase A vor und nach PIRL-Ablation detektiert werden konnten. Grün/Gruppe 2: Features, die ausschließlich in der LC-MS/MS-Analyse der tryptischen Peptide der RNase A nach PIRL-Ablation detektiert werden konnten. Rot/Gruppe 3: Features, die ausschließlich in der LC-MS/MS-Analyse der tryptischen Peptide der RNase A vor PIRL-Ablation detektiert werden konnten.

Das Ergebnis des FeatureLinker-Knotens ist in Abbildung 16 graphisch dargestellt. Die detektierten Features der ablatierten Probe sind als grüne Punkte dargestellt und die Features der nicht-ablatierten als rote Punkte. Die Features, die in beiden LC-MS/MS-Analysen detektiert und vom FeatureLinker einander zugeordnet werden konnten, befinden sich in der Graphik direkt nebeneinander, da sie nahezu identische  $m/z$ -Werte und RTs besaßen. Die Features, die von dem FeatureLinker nicht einander zugeordnet werden konnten (Feature-Gruppe 2 und 3) sind in Abbildung 16 mit Zahlen gekennzeichnet. Um zu untersuchen, ob die Features tatsächlich nur in der ablatierten bzw. nicht-ablatierten Probe vorhanden waren, wurden die Rohdaten der LC-MS/MS-Analysen manuell analysiert. Die manuelle Analyse der Rohdaten ergab, dass alle Signale, die laut der OpenMS-Analyse ausschließlich in der LC-MS/MS-Analyse der RNase nach PIRL-Ablation bzw. vor PIRL-Ablation vorhanden waren, tatsächlich auch in der jeweils anderen Probe identifiziert werden konnten.



**Abbildung 16: Graphische Darstellung der Ergebnisse des FeatureLinkers der Identifizierungsunabhängigen OpenMS-Prozessierungskette.** rot: Features, die ausschließlich in der LC-MS/MS-Analyse der tryptischen Peptide der RNase A vor PIRL-Ablation detektiert werden konnten. grün: Features, die ausschließlich in der LC-MS/MS-Analyse der tryptischen Peptide der RNase A nach PIRL-Ablation detektiert werden konnten. Features, die ausschließlich vor oder nach PIRL-Ablation detektiert werden konnten, sind mit Zahlen gekennzeichnet. Ordinate: Masse-zu-Ladungsverhalten [Th]. Abszisse: Retentionszeit [sec].



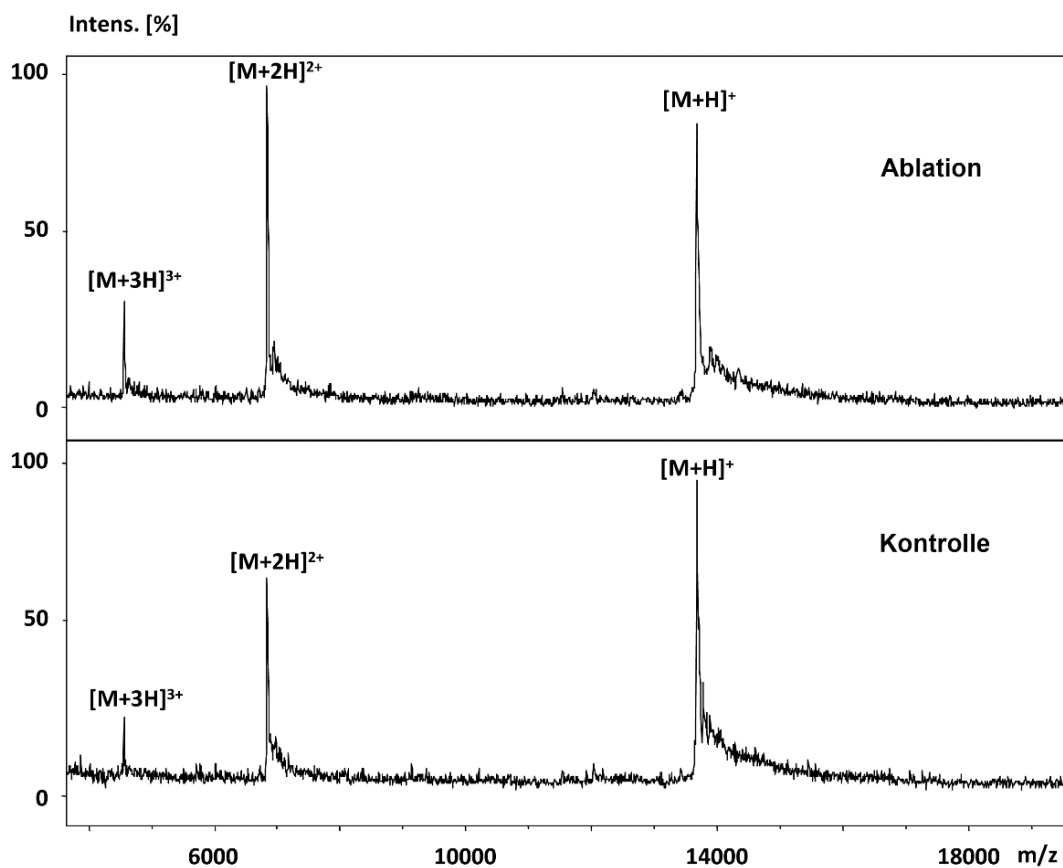


**Abbildung 17: MS-Spektren der in Abbildung 16 markierten tryptischen Peptide.** Oben: Ausschnitt des MS-Spektrums des entsprechenden Peptids in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation. Unten: Ausschnitt des MS-Spektrums des entsprechenden Peptids in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-

Ablation. A: In Abbildung 16 mit 1 markiertes Signal ( $m/z$  1430,08;  $z=2$ , RT= 1464 Sekunden). B: In Abbildung 16 mit 2 markiertes Signal ( $m/z$  1369;  $z=10$ , RT= 1599 Sekunden). C: In Abbildung 16 mit 3 markiertes Signal ( $m/z$  1190,44;  $z=2$ , RT= 1270 Sekunden). D: In Abbildung 16 mit 4 markiertes Signal ( $m/z$  1206,4;  $z=2$ , RT= 1577 Sekunden). E: In Abbildung 16 mit 5 markiertes Signal ( $m/z$  1151,46;  $z=2$ , RT= 1430 Sekunden). F: In Abbildung 16 mit 6 markiertes Signal ( $m/z$  1157,45;  $z=2$ , RT= 1558 Sekunden). G: In Abbildung 16 mit 7 markiertes Signal ( $m/z$  1126,53;  $z=2$ , RT= 1836 Sekunden). H: In Abbildung 16 mit 8 markiertes Signal ( $m/z$  997,97;  $z=2$ , RT= 1797 Sekunden). I: In Abbildung 16 mit 9 markiertes Signal ( $m/z$  959,04;  $z=3$ , RT= 1390 Sekunden). J: In Abbildung 16 mit 10 markiertes Signal ( $m/z$  927,37;  $z=3$ , RT= 1367 Sekunden). K: In Abbildung 16 mit 11 markiertes Signal ( $m/z$  890,40;  $z=3$ , RT= 1613 Sekunden). L: In Abbildung 16 mit 12 markiertes Signal ( $m/z$  807,97;  $z=3$ , RT= 1245 Sekunden). M: In Abbildung 16 mit 13 markiertes Signal ( $m/z$  798,3;  $z=3$ , RT= 1402 Sekunden). N: In Abbildung 16 mit 14 markiertes Signal ( $m/z$  808,89;  $z=2$ , RT= 1488 Sekunden). O: In Abbildung 16 mit 15 markiertes Signal ( $m/z$  847,06;  $z=3$ , RT= 1580 Sekunden). P: In Abbildung 16 mit 16 markiertes Signal ( $m/z$  800,37;  $z=2$ , RT= 1635 Sekunden). Q: In Abbildung 16 mit 17 markiertes Signal ( $m/z$  803,72;  $z=3$ , RT= 1762 Sekunden). R: In Abbildung 16 mit 18 markiertes Signal ( $m/z$  799,28;  $z=3$ , RT= 1222 Sekunden). S: In Abbildung 16 mit 19 markiertes Signal ( $m/z$  766,84;  $z=2$ , RT= 1298 Sekunden). T: In Abbildung 16 mit 20 markiertes Signal ( $m/z$  768,3;  $z=3$ , RT= 1430 Sekunden). U: In Abbildung 16 mit 21 markiertes Signal ( $m/z$  751,35;  $z=3$ , RT= 1830 Sekunden). V: In Abbildung 16 mit 22 markiertes Signal ( $m/z$  743,84;  $z=2$ , RT= 1299 Sekunden). W: In Abbildung 16 mit 23 markiertes Signal ( $m/z$  653,31;  $z=2$ , RT= 1422 Sekunden). X: In Abbildung 16 mit 24 markiertes Signal ( $m/z$  637,04;  $z=4$ , RT= 1725 Sekunden). Y: In Abbildung 16 mit 25 markiertes Signal ( $m/z$  538,17;  $z=2$ , RT= 1325 Sekunden). Z: In Abbildung 16 mit 26 markiertes Signal ( $m/z$  484,2;  $z=4$ , RT= 1239 Sekunden).

### 7.1.2 Massenspektrometrische Analyse der intakter RNase A vor und nach PIRL-Ablation mit der MALDI-MS

Neben der massenspektrometrischen Analyse der RNase A vor und nach PIRL-Ablation auf der Peptidebene, wurden die Proben intakt auf der Proteinebene mit der MALDI-MS analysiert. Die MALDI-Spektren der RNase A nach PIRL-Ablation (Ablation) und vor PIRL-Ablation (Kontrolle) zeigten jeweils Signale für die einfach, zweifach und dreifach protonierte intakte RNase A (Abbildung 18). Die  $m/z$ -Werte der einfach protonierten Signale ( $m/z_{\text{Ablation}}$  13682,7,  $m/z_{\text{Kontrolle}}$  13682,1) hatten im Vergleich zu dem theoretischen einfach protonierten



**Abbildung 18:** MALDI MS Spektren der RNase A nach PIRL-Ablation (Ablation) und vor PIRL-Ablation (Kontrolle). Matrix: 2,5-Dihydroxyacetophenon (DHAP). Ablation:  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  13682,7;  $[M+2H]^{2+}$ ,  $m/z$  6841,4;  $[M+3H]^{3+}$ ,  $m/z$  4561,2. Kontrolle:  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  13683,8;  $[M+2H]^{2+}$ ,  $m/z$  6842,8;  $[M+3H]^{3+}$ ,  $m/z$  4562,3. Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Masse-zu-Ladungsverhältnis [ $m/z$ ]. Abbildung nach Kwiatkowski *et al.* [41].

Masse-zu-Ladungsverhältnis der RNase A ( $m/z$  13691,3; Durchschnittsmasse, engl.: average mass) eine Massenabweichung von 628 ppm (Ablation) bzw. 548 ppm (Kontrolle). Die



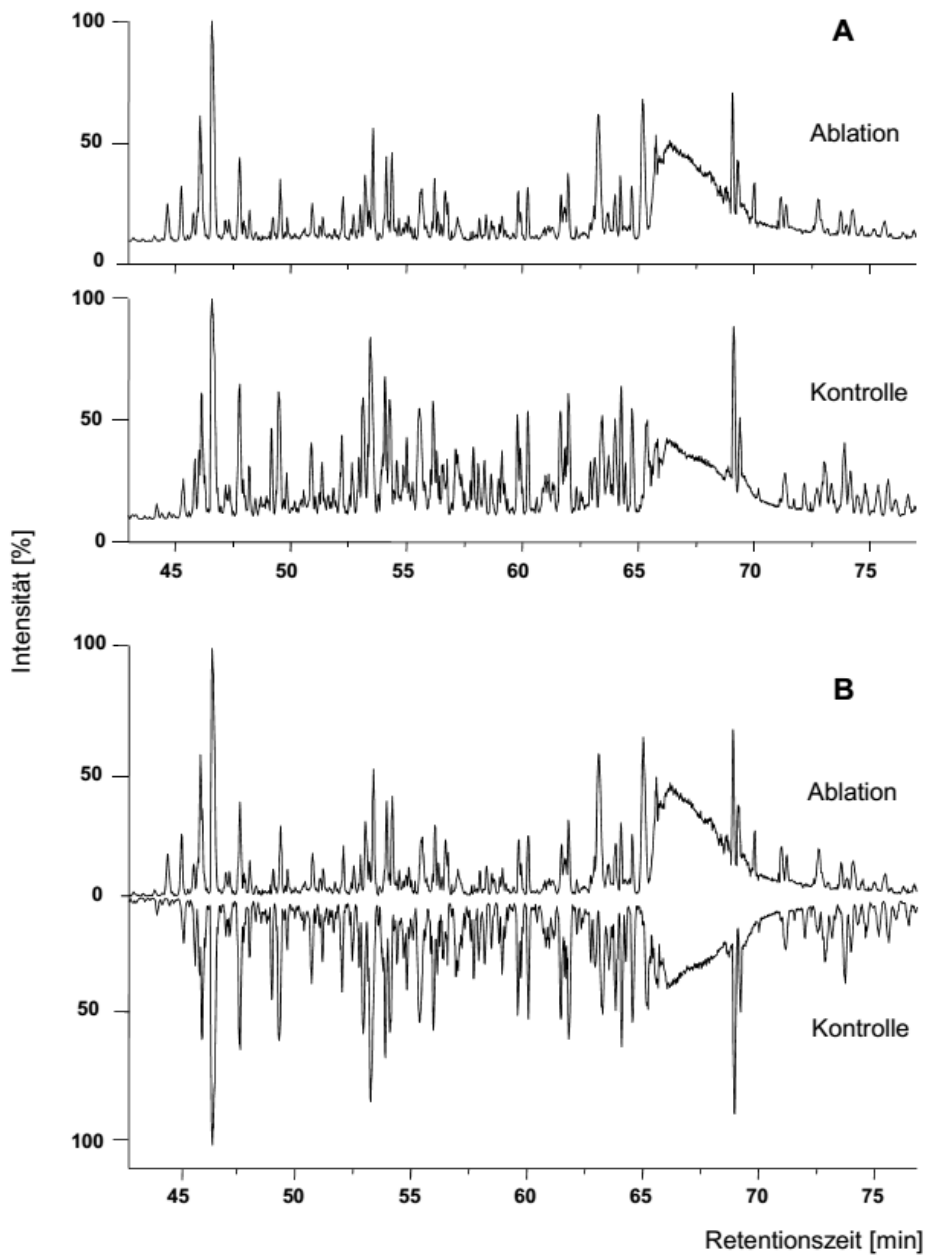
Spektren der RNase A vor und nach PIRL-Ablation waren nahezu identisch. In keinem der beiden Spektren konnte ein Signal detektiert werden, welches nicht auch in dem Spektrum der jeweils anderen Probe vorhanden war.

### **7.1.3 Massenspektrometrische Analyse der intakten RNase A vor und nach PIRL-Ablation mit der LC-ESI-MS**

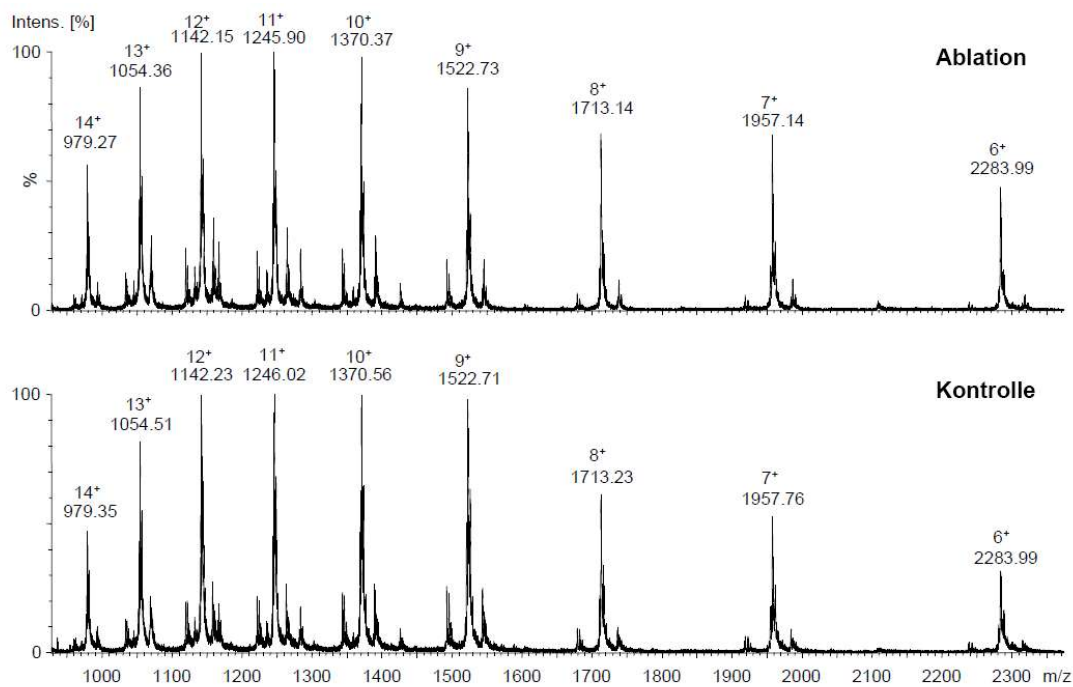
Für eine genauere Analyse der RNase A vor und nach PIRL-Ablation auf der Proteinebene, wurden die Proben mit der LC-ESI-MS analysiert. Die Chromatogramme der RNase A vor PIRL-Ablation (Ablation) und nach PIRL-Ablation (Kontrolle) sind in Abbildung 19 A dargestellt. Sowohl das Chromatogramm der ablatierten RNase A als auch das Chromatogramm der nicht-ablatierten RNase A zeigten zwischen RT 43 min und RT 64 min eine Reihe von Signalen, die nicht durch die intakte RNase A, sondern durch Verunreinigen hervorgerufen wurden. Der breite Peak zwischen RT 65 min und 71 min wurde in beiden Chromatogrammen durch verschiedene Proteinspezies der intakten RNase A verursacht. Die Signale in dem hinteren Bereich der Chromatogramme wurden durch Polymerkontaminationen hervorgerufen. Um die Chromatogramme besser miteinander vergleichen zu können, wurden sie einander gegenübergestellt (Abbildung 19 B). Die Analyse der Chromatogramme zeigte keine signifikanten Unterschiede. Im RT-Bereich 43 min bis 64 min konnte kein Signal identifiziert werden, welches ausschließlich in dem Chromatogramm der RNase A nach PIRL-Ablation bzw. vor PIRL-Ablation vorhanden war. Die intakten RNase A-Spezies eluierten in einem breiten Peak zwischen RT 65 min und 71 min. Das MS-Summenspektrum des entsprechenden RT-Bereichs in Abbildung 20 zeigte eine Reihe mehrfach-geladener Signale verschiedener RNase A-Spezies. Bei den intensivsten Signalen handelte es sich sowohl im Spektrum der ablatierten als auch im Spektrum der nicht-ablatierten RNase A um die Ladungszustände  $z=6$  bis  $z=14$  der intakten, nicht modifizierten RNase A. Für die ablatierte nicht modifizierte RNase A wurde anhand der  $m/z$ -Werte ein einfach protoniertes Masse-zu-Ladungsverhältnis von  $m/z$  13695,2 ermittelt. Für die nicht-ablatierte Probe wurde ein einfach protoniertes Masse-zu-Ladungsverhältnis von  $m/z$  13696,1 Da berechnet. Im Vergleich zu dem theoretischen einfach protonierten Masse-zu-Ladungsverhältnis der nicht modifizierten RNase A ( $m/z$  13691,3) entsprach dies einer Massenabweichung von 284,9 ppm (Ablation) bzw. 350,6 ppm (Kontrolle). Die beiden Spektren waren nahezu identisch (Abbildung 20) und es konnte kein qualitativer Unterschied festgestellt werden. Weder in dem Spektrum der RNase A vor noch



in dem Spektrum der RNase A nach PIRL-Ablation konnte ein Signal identifiziert werden, welches nicht auch in dem jeweils anderen Spektrum vorhanden war.

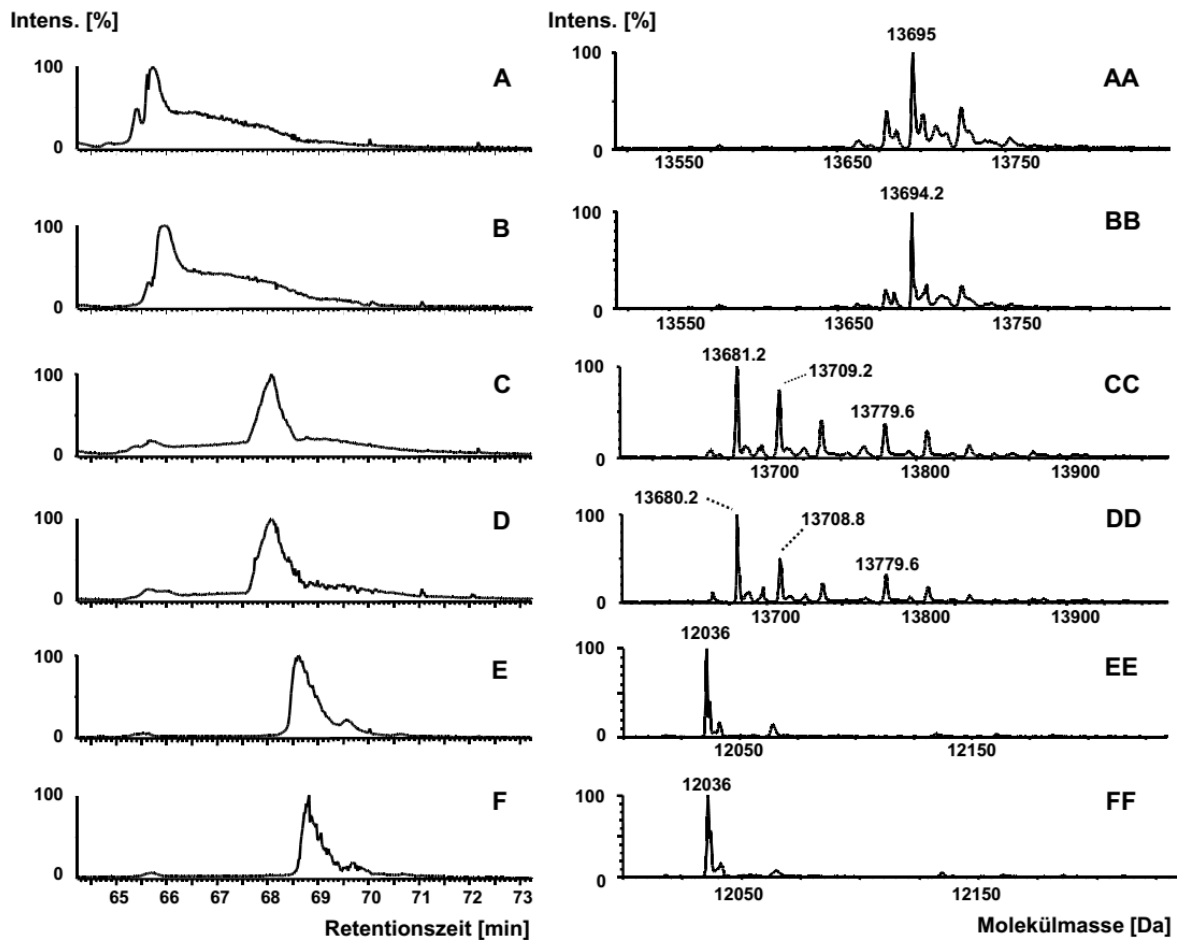


**Abbildung 19: Basis-Peak-Chromatogramme der nanoUPLC-ESI-Q-TOF-MS-Analyse der intakten ablatierten (Ablation) und nicht-ablatierten (Kontrolle) RNase A.** A: BPCs der ablatierten und nicht-ablatierten RNase A. B: Gegenüberstellung der BPCs der ablatierten und nicht-ablatierten RNase A. Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Retentionszeit [min].



**Abbildung 20: ESI-Q-TOF-MS-Spektrum der intakten, nicht modifizierten RNase A-Spezies.** Ablation: ablatierte RNase A. Kontrolle: nicht-ablatierte RNase A. Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Masse-zu-Ladungsverhältnis [m/z]. Abbildung nach Kwiatkowski *et al.* [41].

Für drei verschiedene RNase A-Spezies wurden EICs und dekonvolutierte Spektren erstellt (Abbildung 21). Bei den RNase A-Spezies handelte es sich um die nicht modifizierte Spezies (Abbildung 21 A, AA, B und BB) und zwei RNase A-Spezies mit einer Molekülmasse von 13779,6 Da (Abbildung 21 C, CC, D, DD) und 12036 Da (Abbildung 21 E, EE, F, FF). Die EICs zeigten für die einzelnen RNase A-Spezies sowohl in der LC-MS-Analyse der intakten RNase A nach PIRL-Ablation als auch vor PIRL-Ablation ein identisches Elutionsverhalten. Für die einzelnen RNase A-Spezies wurde mit Hilfe der EICs Summenspektren generiert. Hierfür wurden MS-Spektren der einzelnen EICs über ihre Halbwertsbreite (full width at half maximum, FWHM) aufsummiert. Im Anschluss wurden die Spektren der ablatierten und nicht-ablatierten RNase A dekonvolutiert und miteinander verglichen. Die dekonvolutierten Spektren waren nahezu identisch und zeigten jeweils gleichen Signale und Signalprofile (Abbildung 21). Sowohl anhand der EICs als auch anhand der dekonvolutierten Spektren konnten zwischen der RNase A vor und nach PIRL-Ablation keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.



**Abbildung 21: Extrahierte-Ionenchromatogramme (EICs) und dekonvolutierte Spektren verschiedener RNase A-Spezies aus der LC-MS-Analyse der intakten RNase A vor PIRL-Ablation (A,C,E, AA, CC, EE) und nach PIRL-Ablation (B, BB, D, DD, F, FF). A:** EIC der nicht modifizierten RNase A-Spezies mit einer Molekülmasse von 13695 Da. **AA:** Dekonvolutierte Spektrum der nicht modifizierten RNase A-Spezies, Molekülmasse= 13695 Da. **B:** EIC der nicht modifizierten RNase A-Spezies, Molekülmasse= 13694,2 Da. **BB:** Dekonvolutierte Spektrum der nicht modifizierten RNase A-Spezies, Molekülmasse= 13694,2 Da. **C und D:** EIC der RNase A-Spezies mit einer Molekülmasse von 13779,6 Da. **CC und DD:** Dekonvolutierte Spektren der RNase A-Spezies mit einer Molekülmasse von 13779,6 Da. **E und F:** EIC der RNase A-Spezies mit einer Molekülmasse von 12036 Da. **EE und FF:** Dekonvolutierte Spektren der RNase A-Spezies mit einer Molekülmasse von 12036 Da.

#### **7.1.4 Vergleich der chemischen Zusammensetzung der zweiten RNase A-Charge vor und nach PIRL-Ablation auf Peptid- und Proteinebene mit der MALDI-MS und der LC-ESI-MS**

Von der zweiten RNase A-Charge wurde ebenfalls die chemische Zusammensetzung der RNase A vor und nach PIRL-Ablation auf der Peptid- und auf der Proteinebene mit der MALDI-MS und der LC-ESI-MS untersucht. Weder in dem MALDI-Spektrum der intakten RNase A noch in den Chromatogrammen und Spektren der LC-ESI-MS-Analysen auf der Peptid- und auf der Proteinebene der RNase A nach PIRL-Ablation konnten Signale identifiziert werden, die nicht auch in den Spektren und Chromatogrammen der RNase A vor PIRL-Ablation vorhanden waren (Abbildung 47, Anhang).

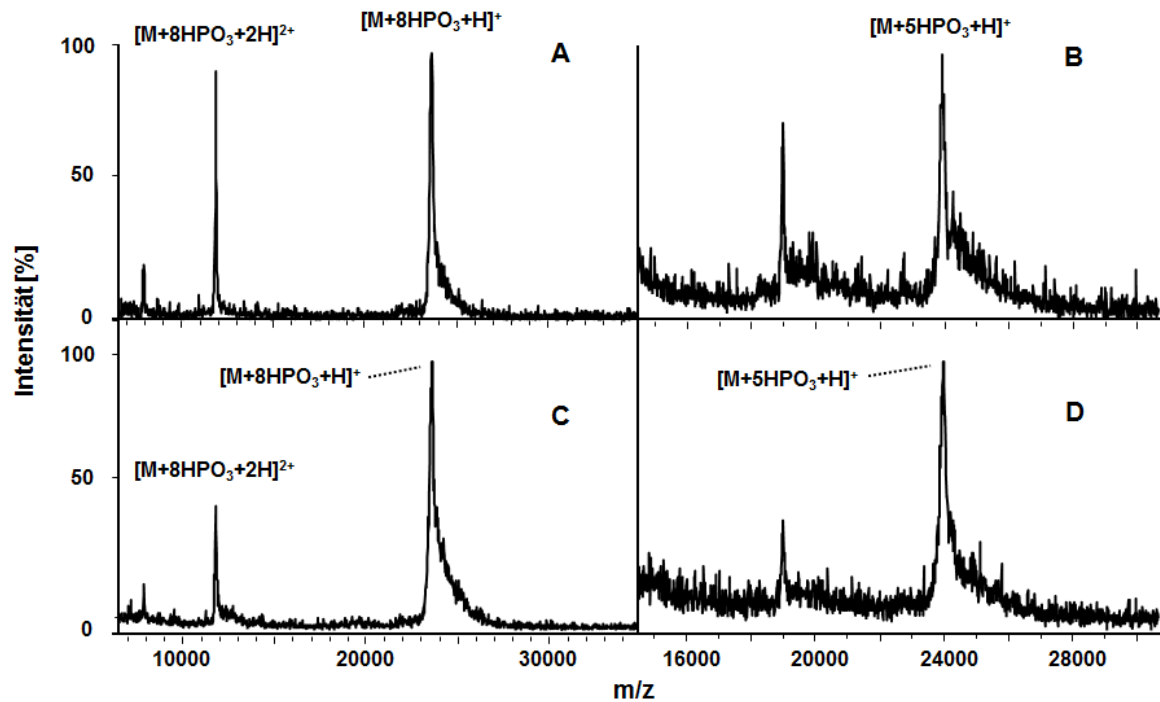
#### **7.2 Vergleich der chemischen Zusammensetzung von Phosphoproteinen vor und nach PIRL Ablation mit der MALDI-MS**

Um zu untersuchen, ob labile posttranslationale Modifizierungen den PIRL-DIVE-Prozess intakt überstehen, wurden als Modellproteine die Phosphoproteine Alpha-S1/S2-Casein (CASA1\_BOVIN, CASA2\_BOVIN) und Beta-Casein (CASB\_BOVIN) mit dem PIRL ablatiert. Im Anschluss wurden die ablatierten (Ablation) Casein-Proteine mit der MALDI-MS analysiert, um zu untersuchen, ob die Phosphorylierungen den PIRL-DIVE-Prozess intakt überstanden haben. Als Kontrolle wurden die nicht-ablatierten Casein-Proteine ebenfalls mit der MALDI-MS analysiert. Neben der Analyse auf der Proteinebene wurden die ablatierten und nicht-ablatierten Casein-Proteine auch auf der Phosphopeptidebene analysiert. Für die Analyse auf der Phosphopeptidebene wurden die ablatierten und nicht-ablatierten Casein-Proteine tryptisch verdaut und die Phosphopeptide anschließend mit einer TiO<sub>2</sub>-Mikrosäule angereichert.

##### **7.2.1 Massenspektrometrische Analyse PIRL-ablatierter Phosphoproteine auf der Proteinebene mit der MALDI-MS**

Die MALDI-Spektren intakter Casein-Proteine (Alpha-S1-, Alpha-S2- und Beta-Casein) vor und nach PIRL-Ablation sind in Abbildung 22 dargestellt. Die Spektren des ablatierten und nicht-ablatierten Alpha-Caseingemisches (Abbildung 22 A und Abbildung 22 C) sind nahezu identisch

und zeigen jeweils zwei abundante Signale (Ablation:  $m/z$  11801,57;  $m/z$  23600,22; Kontrolle:  $m/z$  11807,24;  $m/z$  23585,02). Bei den Signalen handelte es sich sowohl bei der Probe vor als auch bei der Probe nach PIRL-Ablation um die einfach (Ablation:  $m/z$  23600,22, Kontrolle:  $m/z$  23585,02) und die zweifach protonierte Variante (Ablation:  $m/z$  11801,57, Kontrolle: 11807,24) der achtfach phosphorylierten Alpha-S1-Casein-Spezies. Im Vergleich zu dem theoretischen einfach protonierten Masse-zu-Ladungsverhältnis der achtfach phosphorylierten Alpha-S1-Casein-Spezies ( $m/z$  23615,72, Durchschnittsmasse, average mass) hatten die gemessenen  $m/z$ -Werte eine Massenabweichung von -657,6 ppm (Ablation) bzw. -1300 ppm (Kontrolle). In keinem der beiden MALDI-Spektren konnte ein Signal für die nicht-phosphorylierte Spezies des Alpha-S1- ( $m/z$ : 22975,88) oder Alpha-S2-Caseins ( $m/z$ : 24349,55) detektiert werden. Darüber hinaus zeigte keines der MALDI-Spektren ein Signal, welches einem Neutralverlust einer Phosphatgruppe in Form von  $H_3PO_4$  entsprechen würde. Die MALDI-Spektren des intakten Beta-Caseins sind in Abbildung 22 B (Kontrolle) und Abbildung 22 C (Ablation) dargestellt. Die beiden MALDI-Spektren zeigen ein intensives Signal bei  $m/z$  23964,8 (Kontrolle) und  $m/z$  23987,45 (Ablation). Darüber hinaus zeigen beide Spektren ein weiteres Signal bei  $m/z$  18988,31 (Kontrolle) bzw.  $m/z$  19001,12 (Ablation). Das Signal bei knapp 19 kDa wurde hervorgerufen durch die einfach protonierte Form des Kappa-Caseins (CASK\_BOVIN). Bei den detektierten Signalen  $m/z$  23964,8 (Kontrolle) und  $m/z$  23987,45 (Ablation) handelte es sich jeweils um das einfach protonierte Signal der fünffach phosphorylierten Beta-Casein-Spezies. Verglichen mit dem theoretischen einfach protonierten Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$  23984,19) hatten die gemessenen  $m/z$ -Werte der fünffach phosphorylierten Beta-Casein-Spezies eine Massenabweichung von - 808,4 ppm (Kontrolle) bzw. von 135,9 ppm. Das MALDI-Spektrum des ablatierten (Abbildung 22 D) und nicht-ablatierten (Abbildung 22 B) Beta-Caseins zeigte kein Signal für die nicht-phosphorylierte Beta-Casein-Spezies ( $m/z$  23584,29). Darüber hinaus konnte weder im Spektrum des Beta-Caseins nach PIRL-Ablation noch im Spektrum des Beta-Caseins vor PIRL-Ablation ein Signal für einen Neutralverlust der Phosphatgruppen detektiert werden.

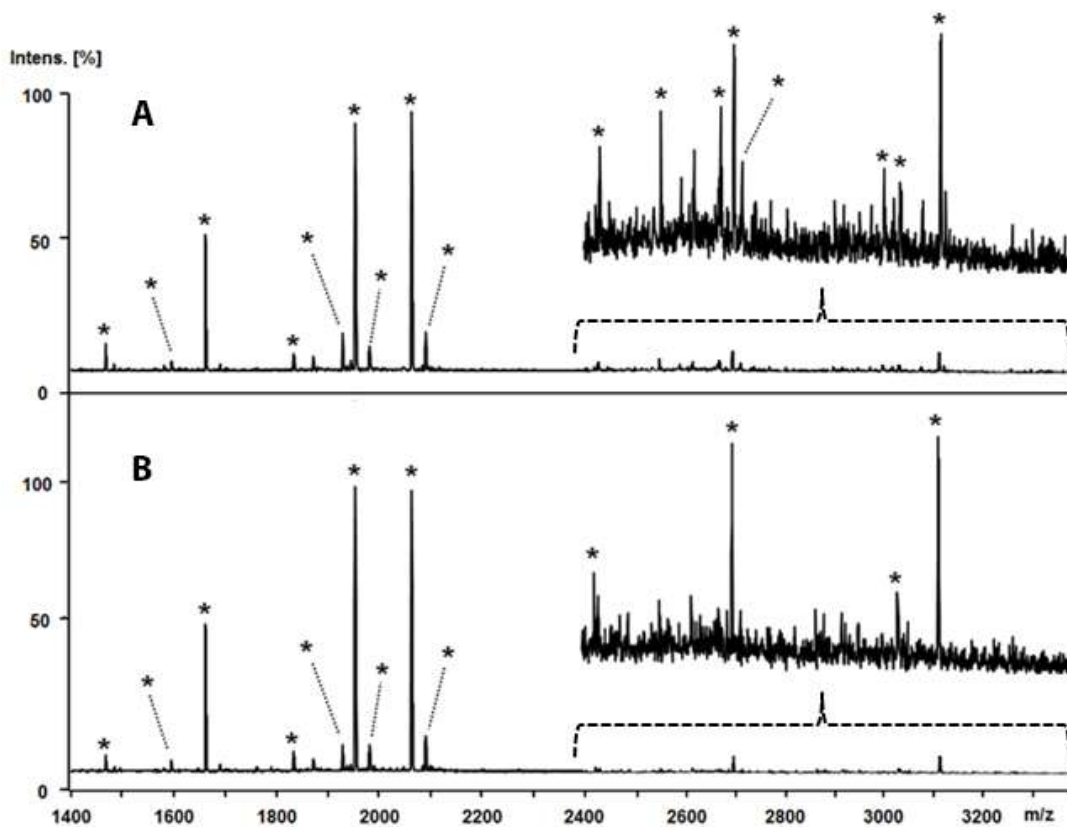


**Abbildung 22: Spektren der MALDI-MS-Analyse der intakten Phosphoproteine Alpha-S1/S2-Casein und Beta-Casein.** A: MALDI-MS-Spektrum der Alpha-S1/S2-Casein-Probe vor PIRL-Ablation,  $[M+8HPO_3+H]^+$  = m/z 23585,02;  $[M+8HPO_3+2H]^{2+}$  = 11807,24. B: MALDI-MS-Spektrum der Beta-Casein-Probe vor PIRL-Ablation,  $[M+5HPO_3+H]^+$  = m/z 23964,8. C: MALDI-MS-Spektrum der Alpha-S1/S2-Casein-Probe nach PIRL-Ablation,  $[M+8HPO_3+H]^+$  = m/z 23600,22;  $[M+8HPO_3+2H]^{2+}$  = 11801,57. D: MALDI-MS-Spektrum der Beta-Casein-Probe nach PIRL-Ablation,  $[M+5HPO_3+H]^+$  = m/z 23987,45. Matrix: 20 mg/mL DHB, 50% ACN, 0,1% TFA, 1%  $H_3PO_4$ . Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Masse-zu-Ladungsverhältnis [m/z].

### 7.2.2 Vergleich der tryptischen Phosphopeptide der Caseine vor und nach Ablation mit der MALDI-MS

Die mit der  $TiO_2$ -Affinitätschromatographie angereicherten Phosphopeptide wurden mit der MALDI-MS massenspektrometrisch analysiert. Die MALDI-Spektren der Eluate der Affinitätschromatographie der Casein-Probe vor (Kontrolle) und nach (Ablation) PIRL-Ablation sind in Abbildung 23 dargestellt. Die identifizierten Phosphopeptide sind in den Spektren mit einem Stern markiert und in Tabelle 3 zusammengefasst. In dem MALDI-Spektrum der Kontrolle (Abbildung 23 A) konnten insgesamt 14 Phosphopeptide identifiziert werden. Bei den identifizierten Peptiden handelte es sich um zehn einfach phosphorylierte und vier mehrfach phosphorylierte Peptide (Tabelle 3). In dem MALDI-Spektrum des Eluats der Caseine nach PIRL-Ablation (Abbildung 23 B) wurden insgesamt 18 Phosphopeptide identifiziert. Bei

den identifizierten Phosphopeptiden handelte es sich um 11 einfach phosphorylierte Peptide und 7 mehrfach phosphorylierte Peptide (Tabelle 3). Die Analyse der MALDI-Spektren ergab, dass alle Phosphopeptide, die im Spektrum der Kontrolle identifiziert werden konnten, auch im Spektrum der Ablation vorhanden waren. Darüber hinaus konnten im Spektrum der PIRL-Ablation (Abbildung 23 B) vier Phosphopeptide identifiziert werden, die im Spektrum der Kontrolle (Abbildung 23 A) nicht vorhanden waren. Bei den vier Phosphopeptiden handelte es sich um ein einfach ( $m/z$  2556,2) und drei mehrfach phosphorylierte Peptide ( $m/z$  2678,01,  $m/z$  2720,91,  $m/z$  3007,7) mit einer jeweils niedrigen Signalintensität in dem MALDI-Spektrum.



**Abbildung 23: Massenspektren der MALDI-MS-Analyse.** Probe: Eluate der  $\text{TiO}_2$ -Affinitätschromatographie des tryptischen Verdauers der Caseine Alpha-S1-, Alpha-S2- und Beta-Casein nach (A) und vor (B) PIRL-Ablation. Matrix: 20 mg/mL DHB, 50% ACN, 0,1% TFA, 1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . \*: identifizierte Phosphopeptide. Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Masse-zu-Ladungsverhältnis [m/z].

**Tabelle 3: Liste der identifizierten Phosphopeptide des Alpha- und Beta-Caseins.** <sup>#1</sup> Das  $\alpha$ -S1-(95-105)-Peptid mit der Sequenz YLGEYLIVPNSAEER stellt eine neue Sequenzvariante des  $\alpha$ -S1-Caseins dar [42]. <sup>#2</sup> Formylierung am Lysin. <sup>#3</sup> Formylierung am N-Terminus des Peptides. <sup>#4</sup> N-Terminal Q $\rightarrow$ Pyr [43]. M(ox.): Das Methionin lag als Methioninsulfoxid vor. PIRL-DIVE: MALDI-Spektrum der TiO<sub>2</sub>-Affinitätschromatographie nach PIRL-Ablation. Kontrolle: MALDI-Spektrum der TiO<sub>2</sub>-Affinitätschromatographie vor PIRL-Ablation. X: Peptid wurde im MALDI-MS-Spektrum identifiziert. Freier Bereich: Peptide konnte im MALDI-Spektrum nicht identifiziert werden. n (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>): Anzahl der Phosphorylierungen.

Peptidsequenz	n(PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )	[M+H] <sup>+</sup>	PIRL-DIVE	Kontrolle
$\alpha$ -S2-(153-164) TVDMESTEVFTK	1	1466,61	X	X
$\alpha$ -S2-(153-164) M(ox.) TVDMESTEVFTK	1	1482,61	X	X
$\alpha$ -S2-(153-165) TVDMESTEVFTKK	1	1594,7	X	X
$\alpha$ -S1-(121-134) VPQLEIVPNSAEER	1	1660,79	X	X
$\alpha$ -S1-(95-105) <sup>#1</sup> YLGEYLIVPNSAEER	1	1832,83	X	X
$\alpha$ -S1-(58-73) DIGSESTEDQAMEDIK	2	1927,69	X	X
$\alpha$ -S1-(119-134) YKVPQLEIVPNSAEER	1	1951,95	X	X
$\alpha$ -S1-(119-134) <sup>#2</sup> YKVPQLEIVPNSAEER	1	1979,97	X	X
$\beta$ -C-(33-48) FQSEEQQTDELQDK	1	2061,83	X	X
$\beta$ -C-(33-48) <sup>#3</sup> FQSEEQQTDELQDK	1	2089,83	X	X
$\beta$ -C-(30-48) IEKFQSEEQQTDELQDK	1	2432,12	X	X
$\beta$ -C(33-52) FQSEEQQTDELQDKIHPF	1	2556,2	X	
$\alpha$ -S1-(52-73) VNELSKDIGSESTEDQAMEDIK	3	2678,01	X	
$\alpha$ -S1-(74-94) <sup>#4</sup> QMEAESISSSEEIVPNSVEAQK	5	2704,5	X	X
$\alpha$ -S1-(74-94) QM(Ox.)EAESISSSEEIVPNSVEAQK	5	2720,91	X	
$\alpha$ -S2-(61-85) NANEEYSIG SSSEESA EVA TEEVK	4	3007,8	X	X
$\beta$ -C-(16-40) RELEELNVPGEIVESLSSSEESITR	3	3042,72	X	X
$\beta$ -C-(16-40) RELEELNVPGEIVESLSSSEESITR	4	3122,27	X	X



### **7.3 Experimente zur Untersuchung der Enzymaktivitäten von Proteasen nach der PIRL-Ablation**

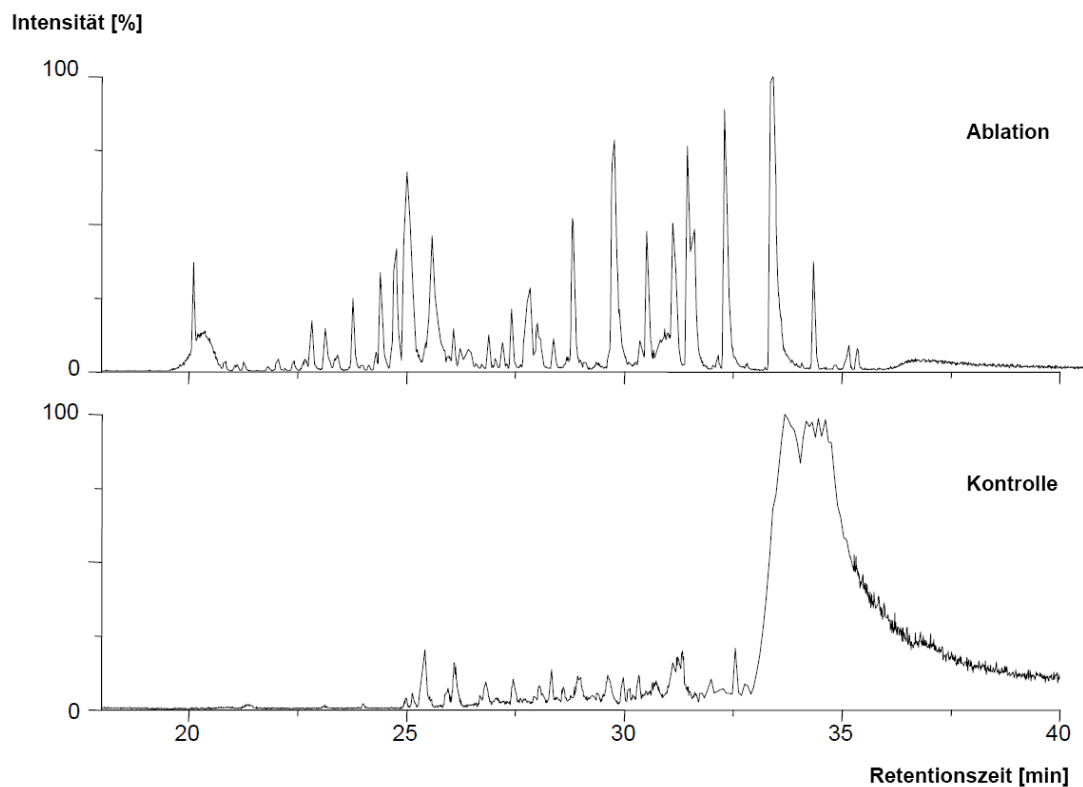
Neben der Charakterisierung der chemischen Zusammensetzung der ablatierten Proteine sollte untersucht werden, ob Proteine nach der PIRL-Ablation weiterhin enzymatisch aktiv waren. Hierfür wurde Trypsin und humanes Blutplasma ablatiert, mit Alpha-S1/S2-Casein (Alpha-Casein) bzw. Angiotensin I (Ang 1-10) inkubiert und die Inkubationsprodukte massenspektrometrisch analysiert.

#### **7.3.1 Untersuchung der enzymatischen Aktivität von Trypsin nach PIRL-Ablation**

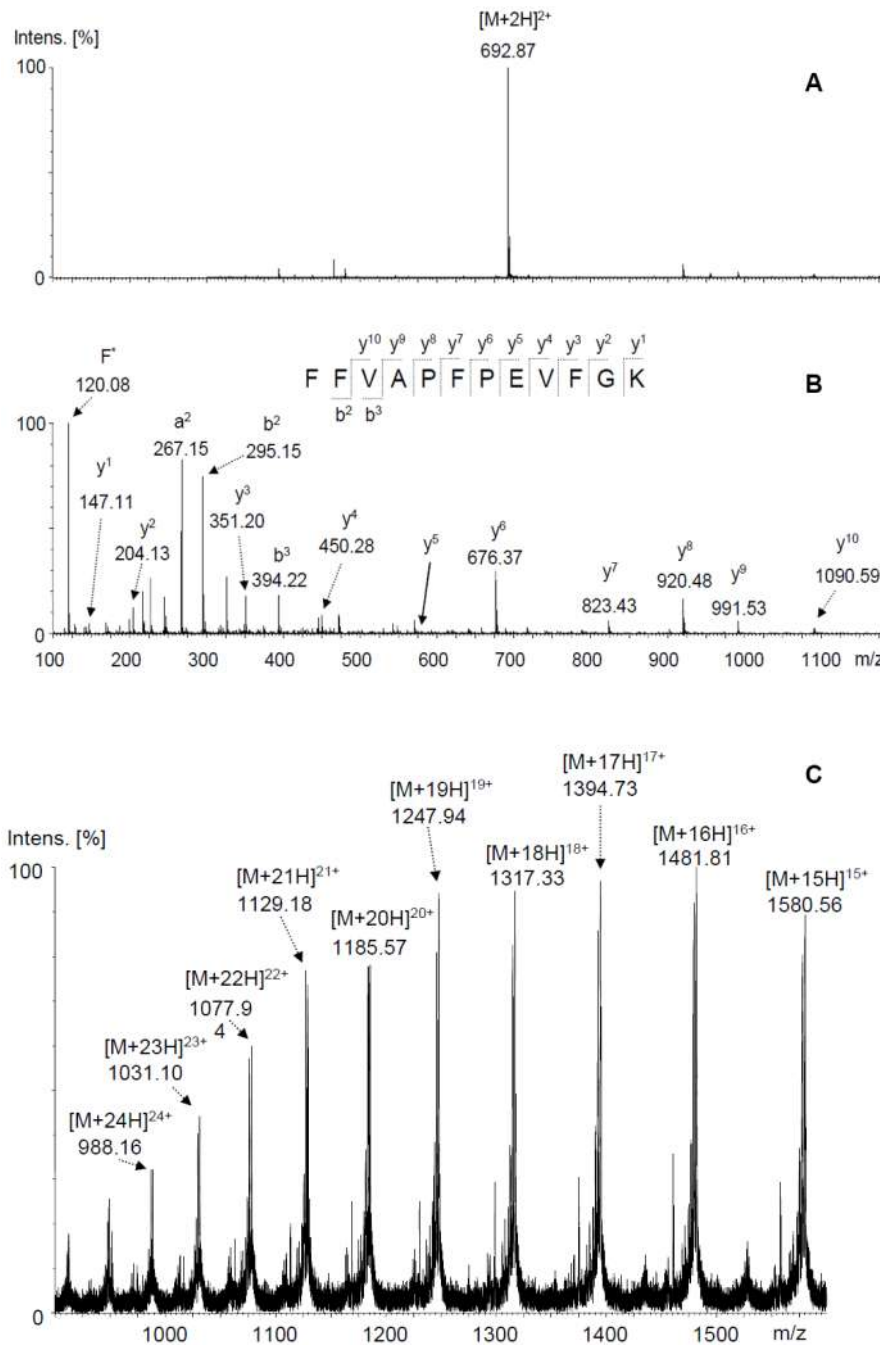
Um zu untersuchen, ob die Trypsinmoleküle nach erfolgter PIRL-Ablation enzymatisch aktiv waren, wurde eine Trypsin-Lösung ( $c = 4,55 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , gelöst in  $100 \text{ mM NH}_4\text{HCO}_3$ ) ablatiert. Die Ablationsprodukte wurden mit einer Kühlfalle aufgefangen und mit Hilfe von flüssigen  $\text{N}_2$  ausgefroren (PIRL-DIVE-Kondensat). Von dem PIRL-DIVE-Kondensat wurde  $1 \mu\text{L}$  mit Alpha-Casein ( $m = 2,9 \text{ mg}$ ) über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert (Ablation). Parallel dazu wurden  $2,9 \text{ mg}$  Alpha-Casein über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  mit dem nicht-trypsinhaltigen Reaktionspuffer inkubiert (Kontrolle). Die Reaktionsprodukte des trypsin- und nicht-trypsinhaltigen Inkubats wurden massenspektrometrisch mit der LC-MS/MS analysiert. Die Chromatogramme der LC-MS/MS-Analysen sind in Abbildung 24 dargestellt. Das Chromatogramm des Inkubats, welches mit dem ablatierten Trypsin inkubiert wurde (Abbildung 24, Ablation), zeigte zwischen RT  $19,5 \text{ min}$  und RT  $35,5 \text{ min}$  eine Reihe von Signalen. Die Analyse der MS und MS/MS-Spektren zeigte, dass die Signale des Chromatogramms durch tryptische Alpha-S1- und Alpha-S2-Casein-Peptide hervorgerufen wurden (Abbildung 25 A und Abbildung 25 B, Tabelle 4 und Tabelle 5). Insgesamt wurden in der LC-MS/MS-Analyse 11 verschiedene tryptische Alpha-S1-Casein-Peptide (51% Sequenzabdeckung) und 7 tryptische Alpha-S2-Casein-Peptide (35% Sequenzabdeckung) identifiziert. Darüber hinaus konnte sowohl im Chromatogramm als auch in den Massenspektren der LC-MS/MS-Analyse kein Signal einer intakten Alpha-S1- oder Alpha-S2-Casein-Spezies detektiert werden.

Das Chromatogramm der LC-MS/MS-Analyse der Reaktionsprodukte des nicht-trypsinhaltigen Inkubats (Abbildung 24, Kontrolle) zeigte zwischen RT  $21 \text{ min}$  und RT  $32,5 \text{ min}$  eine Reihe von Signalen mit einer geringen Signalintensität. Die Analyse der MS- und MS/MS-Spektren ergab,

dass keines der Signale von einem tryptischen Peptid des Alpha-S1- oder des Alpha-S2-Caseins hervorgerufen wurde. Neben den niedrig abundanten Signalen zeigte das Chromatogramm einen breiten Peak zwischen RT 33 min und RT 37,5 min. Die Analyse der MS-Spektren des entsprechenden RT-Bereichs zeigte, dass der Peak im Chromatogramm durch intakte Alpha-S1- und Alpha-S2-Casein-Spezies hervorgerufen wurde (Abbildung 25 C). Die Auswertung der MS- und MS/MS-Spektren der LC-MS/MS-Analyse ergab, dass kein einziges tryptisches Peptid für Alpha-S1-Casein und Alpha-S2-Casein identifiziert werden konnte.



**Abbildung 24: Basis-Peak-Chromatogramme (BPCs) der LC-MS/MS-Analysen von Alpha-S1/S2-Casein inkubiert mit PIRL-ablatierten Trypsin (A) und inkubiert mit nicht-trypsinhaltigen Resuspensionspuffer (B).** Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Retentionszeit [min]. Abbildung nach Kwiatkowski *et al.* [41].



**Abbildung 25: ESI-Q-TOF-MS- und -MS/MS-Spektren der LC-MS/MS-Analyse der Alpha-Casein-Inkubate (Abbildung 24).** A: MS-Spektrum der LC-MS/MS-Analyse der Alpha-Casein-Inkubation mit ablatierten Trypsin (RT: 32,41 min). Das Spektrum zeigt ein zweifach geladenes Vorläufer-Peptidion m/z 692,87. B: Fragmentspektrum des Vorläufer-Peptidions (m/z 692,87) mit der identifizierten Peptidsequenz FVAPFPEVFGK (Alpha-S1-Casein) und der annotierten y- und b-Ionenserie; F\*: Phenylalanin-Immoniumion. C: MS-Spektrum der LC-MS/MS-Analyse der Alpha-Casein-Inkubation in Abwesenheit von Trypsin (RT:32-34 min). Das Spektrum zeigt die mehrfach geladenen Signale der intakten, neunfach phosphorylierten Alpha-S1-Casein-Spezies ( $M_r = 23691.4$  Da). Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Masse-zu-Ladungsverhältnis [m/z]. Abbildung nach Kwiatkowski *et al.* [41].

**Tabelle 4: Identifizierte tryptische Alpha-S1-Casein-Peptide in der Inkubation von Alpha-Casein mit dem Kondensat der PIRL-ablatierten Trypsin-Lösung. S: phosphorylierter Serinrest.**

Peptid	p-Wert	Mascot-lonscore	$\Delta m$ [Da]	m/z	z
HIQKEDVPSER	0,00091	60,86	0,0021	669,3451	2
YLGYLEQLRLK	1,50E-05	72,03	0,0122	754,9515	2
YLGYLEQLRLKK	0,0034	46,53	0,0047	818,9952	2
FFVAPFPEVFGKEK	0,0004	63,54	0,0042	821,4395	2
HQGLPQEVLENLLR	0,009	49,61	0,0029	587,3208	3
HQGLPQEVLENLLR	8,10E-05	69,85	0,008	880,4801	2
YKVPQLEIVPNSAEER	0,0034	55,82	-0,0055	976,4771	2
YKVPQLEIVPNSAEER	0,0032	56,06	0,0065	651,3245	3
KYKVPQLEIVPNSAEER	0,0034	55,88	-0,0631	693,9996	3
HPIKHQGLPQEVLENLLR	0,016	45,3	-0,0074	745,7476	3
FFVAPFPEVFGKEKVNELSK	0,0063	51,79	-0,015	771,4107	3
YKVPQLEIVPNSAEERLHSMK	0,032	46,59	-0,0791	637,8014	4
EGIHAQQKEPMIGVNQELAYFPELFR	0,007	52,51	-0,0086	802,6516	4
EGIHAQQKEPMIGVNQELAYFPELFR	0,0024	56,94	0,0128	1.069,8735	3

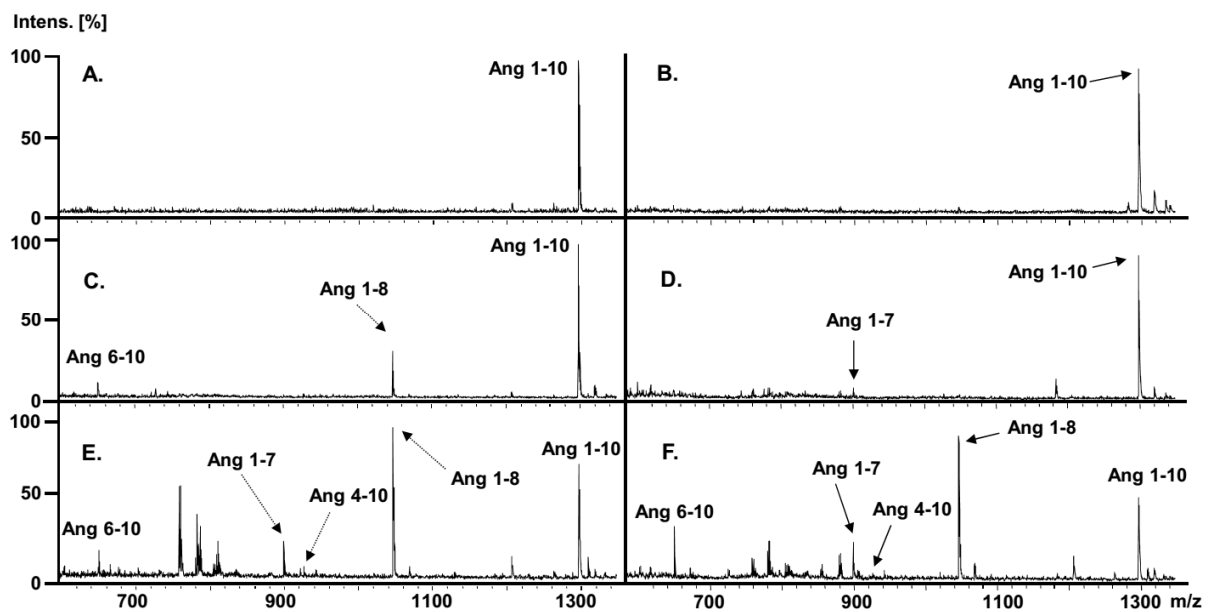
**Tabelle 5: Identifizierte tryptische Alpha-S2-Casein-Peptide in der Inkubation von Alpha-Casein mit dem Kondensat der PIRL-ablatierten Trypsin-Lösung. S: phosphorylierter Serinrest.**

Peptid	p-Wert	Mascot-lonscore	$\Delta M$ [ppm]	m/z	z
AMKPWIQPKTK	0,04	41,57	0,0023	664,3825	2
TVDMESTEVEFTK	4,90E-05	70,94	0,0049	733,8121	2
TVDMESTEVEFTKK	0,013	48,75	0,0089	797,8616	2
NMAINPSKENLCSTFCK	0,00023	67,35	0,0115	671,9817	3
NMAINPSKENLCSTFCKEVVR	2,80E-07	96,88	-0,0494	625,0430	4
NMAINPSKENLCSTFCKEVVR	0,0022	58,19	-0,0128	833,0671	3
NMAINPSKENLCSTFCKEVVR	0,031	45,84	-0,0337	645,0385	4
ALNEINQFYQKFPQYLQYLYQGPIVLPWDQVK	0,02	45,66	-0,0061	1.353,3645	3

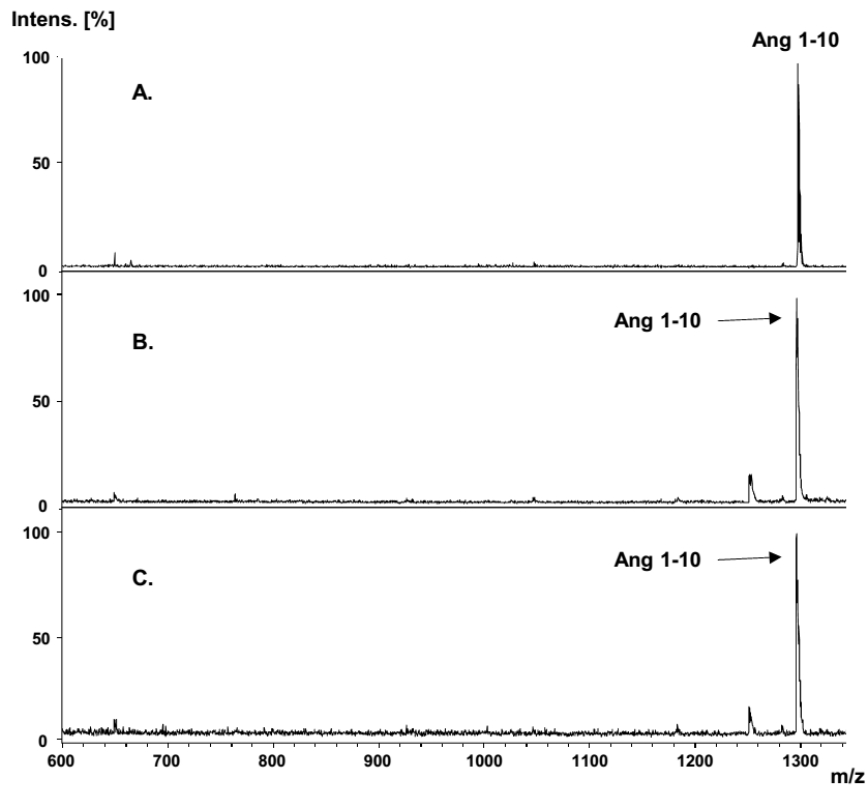
### 7.3.2 Untersuchung der enzymatischen Aktivität von Angiotensin I metabolisierenden Enzymen nach der PIRL-Ablation von humanen Blutplasma

Um zu untersuchen, ob Angiotensin I (Ang 1-10, DRVYIHPFHL) metabolisierende proteolytische Aktivitäten von Plasmaproteinen nach erfolgter PIRL-Ablation nachgewiesen werden können, wurde humanes Blutplasma mit dem PIRL ablatiert. Die Ablationsprodukte wurden mit einer Kühlfalle und flüssigem N<sub>2</sub> aufgefangen (PIRL-DIVE-Kondensat). Von dem PIRL-DIVE-Kondensat wurden nach der Proteinbestimmung 4,75 µg mit einer Angiotensin I-Lösung ( $c = 10^{-5} \text{M}$ ) inkubiert (Ablation). Parallel wurden 4,75 µg nicht-ablatierter humaner Plasmaproteine ebenfalls mit einer Angiotensin I-Lösung ( $c = 10^{-5} \text{M}$ ) inkubiert (Kontrolle). Die Reaktionsprodukte der Ang 1-10-Inkubation wurden nach definierten Zeitpunkten (0 h, 6 h, 24 h) mit der MALDI-MS massenspektrometrisch analysiert. Sowohl das MALDI-Spektrum der Ablation (Abbildung 26 A) als auch das MALDI-Spektrum der Kontrolle (Abbildung 26 B) zeigten zum Zeitpunkt  $t = 0 \text{ h}$  ein abundantes Signal für das nicht prozessierte, intakte Ang 1-10 (Ablation: 1296,69 m/z; Kontrolle: m/z 1296,7). In dem MALDI-Spektrum der Ablation konnten nach sechs Stunden Inkubationszeit ( $t = 6 \text{ h}$ , Abbildung 26 C) zwei Signale detektiert werden. Hierbei handelte es sich bei dem einen Signal um das intakte Ang 1-10 (m/z 1296,68). Das zweite Signal (m/z 1046,55) wurde hervorgerufen durch das Angiotensin II (Ang 1-8, DRVYIHPF). Das MALDI-Spektrum der Kontrolle zeigte nach sechs Stunden Inkubationszeit ( $t = 6 \text{ h}$ , Abbildung 26 D) ein abundantes Signal für das intakte Ang 1-10 (m/z 1296,71) sowie ein Signal bei m/z 899,49 für das Angiotensin 1-7 (Ang 1-7, DRVYIHP). Nach 24 Stunden ( $t = 24 \text{ h}$ ) Inkubationszeit konnten sowohl im MALDI-Spektrum der Ablation (Abbildung 26 E) als auch im MALDI-Spektrum der Kontrolle (Abbildung 26 F) das intakte Ang 1-10 identifiziert werden (m/z 1296,7). Darüber hinaus konnten in den Spektren der Ablation und der Kontrolle jeweils Signale für das Ang 1-8 (m/z 1046,5), Ang 1-7 (m/z 899,5) sowie das Ang 4-10 (m/z 926,5; YIHPFHL) und das Ang 6-10 (m/z 650,36; HPFHL) identifiziert werden. Neben diesen Signalen zeigten die MALDI-Spektren der Ablation und Kontrolle zum Zeitpunkt  $t = 24 \text{ h}$  weitere Signale, die keinem Produkt der Ang 1-10-Metabolisierung zugeordnet werden konnte und sowohl im Spektrum der Ablation als auch im Spektrum der Kontrolle vorhanden waren. Als zusätzliche Kontrolle wurde die Umgebungsluft für 5 min mit der Membranpumpe eingesogen und mit der Kühlfalle aufgefangen. Das gewonnene Kondensat wurde ebenfalls mit Ang 1-10 ( $c = 10^{-5} \text{M}$ ) inkubiert und die Inkubate nach definierten Zeitpunkten ( $t = 0 \text{ h}$ ,  $t = 6 \text{ h}$ ,  $t = 24 \text{ h}$ ) mit der MALDI-MS analysiert. Durch dieses Kontrollexperiment sollte sichergestellt werden, dass die

beobachtete Ang 1-10-Prozessierung auf Ang 1-10 metabolisierende Enzyme zurückzuführen ist, die nach der PIRL-Ablation des humanen Blutplasmas enzymatisch aktiv waren und nicht durch Kontaminationen aus der Umgebungsluft. Die MALDI-Spektren zeigten zum Zeitpunkt  $t = 0$  h,  $t = 6$  h und  $t = 24$  h jeweils ein sehr intensives Signal für das nicht prozessierte Ang 1-10 (Abbildung 27). In den MALDI-Spektren konnte kein Signal für ein Produkt der Ang 1-10-Metabolisierung identifiziert werden.



**Abbildung 26: MALDI-MS Spektren von Ang 1-10 ( $c = 10^{-5}$  M) inkubiert mit ablatierten (A, C, E) und nicht-ablatierten (B, D, F) humanen Plasmaproteinen.** Die Reaktionsprodukte wurden mit der MALDI MS nach 0 h (A, B), 6 h (C, D) und 24 h (E, F) detektiert. Die generierten Angiotensin-Peptide sind mit Pfeilen markiert. Matrix: 20 mg/mL DHB, 50% ACN, 0,1% TFA. Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Masse-zu-Ladungsverhältnis [m/z].  
Abbildung nach Kwiatkowski *et al.* [41].



**Abbildung 27: MALDI-MS Spektren von Ang 1-10 ( $c= 10^{-5}$  M) inkubiert mit der kondensierten Umgebungsluft.** Die Reaktionsprodukte wurden mit der MALDI MS nach 0 h (A), 6 h (B) und 24 h (C) detektiert. Das nicht prozessierte Ang 1-10-Peptide ist in B und C mit einem Pfeil markiert. Matrix: 20 mg/mL DHB, 50% ACN, 0,1% TFA. Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Masse-zu-Ladungsverhältnis [m/z].

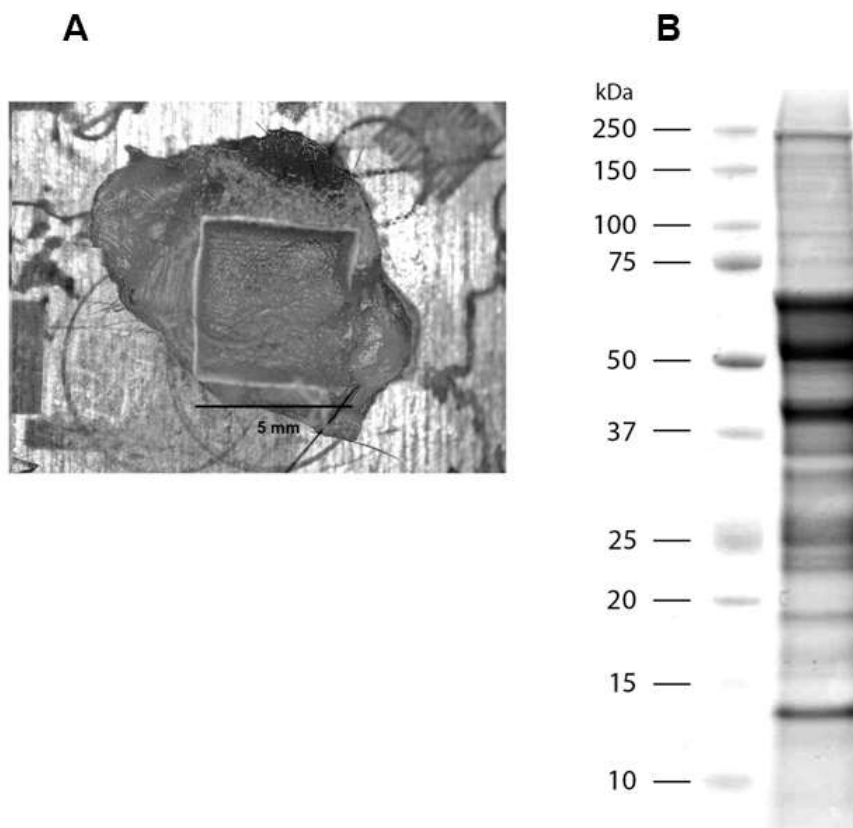
## 7.4 Experimente zur Freisetzung von Proteinen aus Geweben durch PIRL-Ablation

Um die Frage zu beantworten, ob es mit der PIRL-Ablation möglich ist, Proteine aus Geweben freizusetzen und ob die freigesetzten Proteine mit Methoden der Protein- und Proteomanalytik analysiert werden können, wurden verschiedene Gewebe (Muskel- und Lebergewebe von der Maus sowie drei humane Tonsillen) mit dem PIRL ablatiert. Die Ablationsprodukte wurden mit einer Kühlfalle aufgefangen und mit Methoden der Protein- und Proteomanalytik analysiert.

### 7.4.1 PIRL Ablation von Proteinen aus murinen Muskelgewebe

Mit dem PIRL wurde eine Fläche von 25 mm<sup>2</sup> (5 mm x 5 mm) und 1,5 mm Tiefe eines Mausmuskels (Femur) für 5 min ablatiert (Abbildung 28 A) und die Ablationsprodukte wurden in einer Waschflasche, die mit flüssigen N<sub>2</sub> umgeben war, aufgefangen. Das Volumen des PIRL-

DIVE-Kondensats betrug 50  $\mu\text{L}$ . Die Proteinbestimmung mit dem NanoDrop Spektralphotometer ergab eine Proteinkonzentration von  $c = 19,33 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Abbildung 48, Anhang). Die freigesetzte Gesamtproteinmenge betrug damit 966,5  $\mu\text{g}$ . Ein identisches Volumen des Mausmuskels wurde lyophilisiert und die Proteine unter konventionellen Bedingungen freigesetzt bzw. extrahiert. Die gesamte Prozedur dauerte knapp drei Tage. Die Proteinbestimmung des konventionellen Proteinextrakts mit dem NanoDrop Spektralphotometer ergab eine Konzentration von  $c = 0,175 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Abbildung 48, Anhang). Das Volumen des Proteinextrakts betrug 1000  $\mu\text{L}$ , so dass die konventionelle Proteinextraktion eine Gesamtausbeute von 175  $\mu\text{g}$  lieferte. Von dem PIRL-DIVE-Kondensat wurden insgesamt 145  $\mu\text{g}$  für die Gelelektrophorese ohne weitere Probenvorbereitung auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Die SDS-PAGE zeigte über den gesamten Trennbereich eine Vielzahl von Banden (Abbildung 28 B). Einzelne Gelbanden wurden ausgeschnitten, tryptisch verdaut und



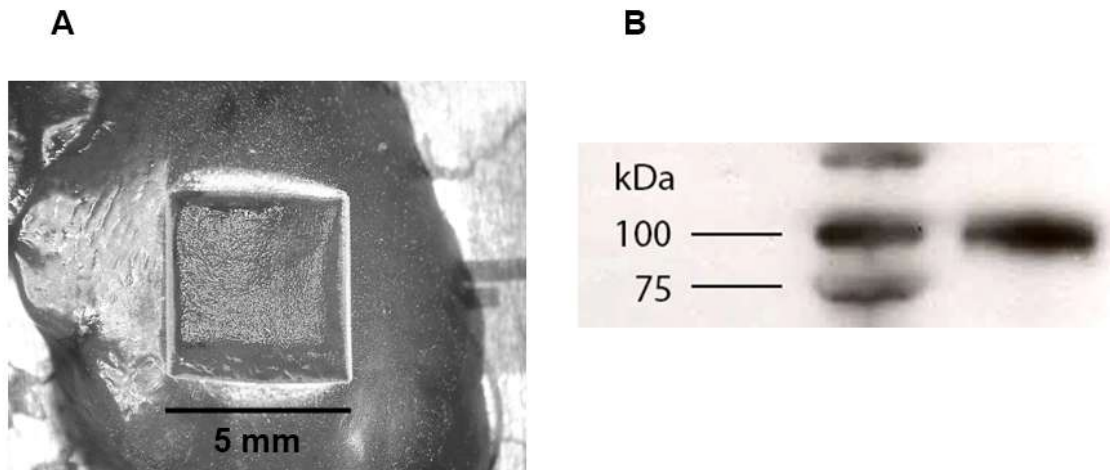
**Abbildung 28: Mit dem PIRL bestrahltes Mausmuskelgewebe (A) und SDS-PAGE der ablatierten Proteine (B).**  
 A: Mit dem PIRL bestrahltes Mausmuskelgewebe. Es wurde eine Fläche von 5 mm x 5 mm mit dem PIRL für 5 min bestrahlt. B: SDS-PAGE der Ablationsprodukte, die mit einer Kühlfalle und flüssigen N<sub>2</sub> aufgefangen wurden. Links: Proteinstandard. Rechts: Proteine des PIRL-DIVE-Kondensats (aufgetragene Proteinmenge:  $m = 145 \mu\text{g}$ ).  
 Abbildung nach Kwiatkowski *et al.* [41].



massenspektrometrisch analysiert. Die Ergebnisse der LC-MS/MS-Analyse zeigten, dass die obere Bande knapp unterhalb der 250 kDa-Markerbande durch verschiedene Myosin-Proteine hervorgerufen wurde. Die theoretische Molekülmasse der identifizierten Myosine ( $m = 222 \text{ kDa}$ ) stimmt mit der Position der Bande im Gel überein. Für das Myosin-4 ( $m = 222720 \text{ Da}$ ) wurden insgesamt 66 verschiedene Peptide identifiziert (Sequenzabdeckung = 35%), die sich über den gesamten Sequenzbereich verteilten. In der obersten Bande direkt unterhalb der Ladungstasche wurde in der LC-MS/MS-Analyse das muskelassoziierte Protein Titin identifiziert. Von diesem Protein, das eine theoretische Molekülmasse von  $m = 3,8 \text{ MDa}$  besitzt, wurden insgesamt 86 verschiedene Peptide identifiziert.

#### **7.4.2 Nachweis eines durch PIRL freigesetzten Proteins aus dem PIRL-DIVE-Kondensat mittels Western Blot-Analyse**

Um zu untersuchen, ob das PIRL-DIVE-Kondensat mit der Western Blot-Analyse kompatibel ist, wurde das Gewebe einer Mausleber mit dem PIRL bestrahlt. Es wurde insgesamt eine Fläche von  $37,5 \text{ mm}^3$  ( $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm} \times 1,5 \text{ mm}$ ) mit dem PIRL ablatiert (Abbildung 29 A). Das Kondensat besaß ein Volumen von  $V = 40 \text{ }\mu\text{L}$  und hatte eine Proteinkonzentration von  $c = 20,1 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Abbildung 48, Anhang). Für die Western Blot-Analyse wurden  $2 \text{ }\mu\text{L}$  des PIRL-DIVE-Kondensats ohne weitere Probenvorbereitung für die SDS-PAGE auf ein Gel aufgetragen. Die Proteine wurden nach der Gelelektrophorese auf eine Blotmembran transferiert und mit einem anti-CEACAM1-Antiserum P1 Antikörper inkubiert [44]. Der Immunoblot zeigte ein intensives Signal knapp über der 100 kDa-Markerbande (Abbildung 29 B). Die Position der Bande stimmt mit der, in der Literatur beschriebenen, Molekülmasse ( $m = 105 \text{ kDa}$ ) für das glykosylierte Leberprotein CEACAM1 gut überein [45]. Der Immunoblot-Nachweis von CEACAM1 zeigte, dass sich Proteine des PIRL-DIVE-Kondensats mittels Western Blot-Analyse nachweisen lassen. Die Detektion von CEACAM 1 bei knapp über 100 kDa deutet zudem darauf hin, dass die Glykosylierungen den DIVE-Prozess intakt überstanden hatten, da die nicht modifizierte CEACAM1-Spezies eine Molekülmasse von  $m = 53517,8 \text{ Da}$  besitzt.

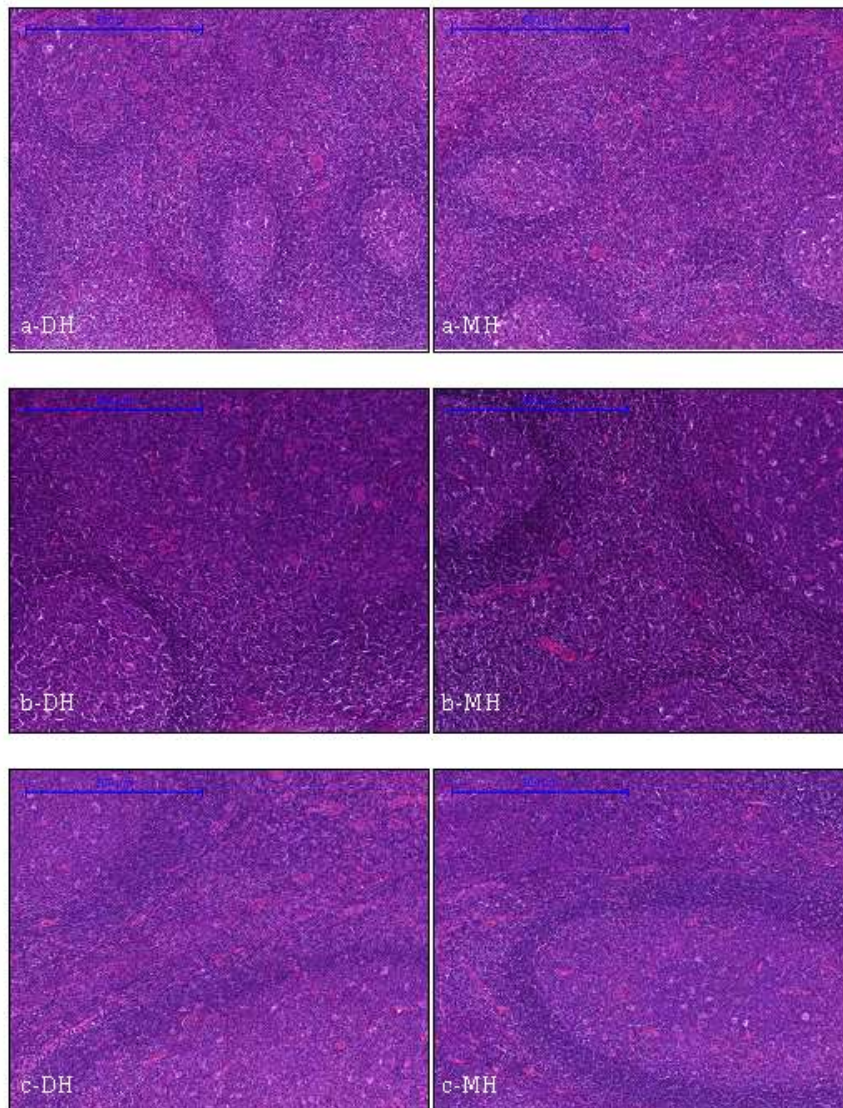


**Abbildung 29: Mit PIRL bestrahltes Mausebergs- und Immunoblot-Detektion des PIRL-ablatierten Leberproteins CEACAM 1.** Eine Fläche von 5 mm x 5 mm wurde mit PIRL für 5 min bestrahlt. Die Abbildung zeigt die ablatierte Fläche des Lebergewebes. B: Detektion von ablatierten Leber CEACAM1 mit Anti-CEACAM1-Antiserum P1. Links: Proteinstandard. Rechts: Ablatierte Mausebergsproteine (m= 40 µg). Die abundante Bande in der rechten Spur läuft bei knapp über 100 kDa und wurde hervorgerufen durch das glykosylierte Leberprotein CEACAM1. Abbildung nach Kwiatkowski *et al.* [41].

### 7.4.3 Vergleich der Proteinzusammensetzung von Proteinextrakten humaner Tonsillen nach PIRL-Ablation und nach konventioneller, mechanischer Homogenisierung

Um zu untersuchen, ob sich die Zusammensetzung des Proteoms eines Gewebeproteinextrakts veränderte, wenn die Homogenisierung unter konventionellen Bedingungen (mechanisches Homogenat, MH) oder mit dem PIRL-DIVE-Verfahren (PIRL-DIVE-Homogenat, DH) erfolgte, wurde von drei Patienten während einer Tonsillektomie jeweils eine Tonsille gewonnen (humane Tonsille Nr. 1, Nr. 2 und Nr. 3). Die Tonsillen wurden für die PIRL-DIVE-Gewebehomogenisierung (DTH, engl. PIRL-DIVE-tissue-homogenization) und die mechanische Gewebehomogenisierung (MTH, engl. mechanical tissue homogenization) in jeweils zwei vergleichbare Stücke geteilt. Durch eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde überprüft, dass die Gewebeproben, die für die Experimente verwendet werden sollten, miteinander vergleichbar waren (Abbildung 30). Die Gewebeproben bestanden hauptsächlich aus lymphatischem Gewebe. Beide Färbungen zeigten Lymphfollikel und dazwischen Bindegewebe mit isolierten Blutgefäßen. Die histologische Untersuchung zeigte, dass die

Gewebeproben, die für die mechanische Homogenisierung und die PIRL-Ablation verwendet wurden, miteinander vergleichbar waren. Im Anschluss an die Homogenisierung wurde das MH (mechanische Homogenat) und das DH (PIRL-DIVE-Homogenat) unter identischen Bedingungen aufgearbeitet und mit der zweidimensionalen (2DE, Tonsille Nr. 1, Abbildung 31) und der eindimensionalen Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Abbildung 32 A) analysiert.



**Abbildung 30: Hämatoxylin-Eosin-Färbung der humanen Tonsille.** DH.: Färbung der Gewebeprobe, die für die PIRL-Ablation verwendet wurde (fünffache Vergrößerung). MH.: Färbung der Gewebeprobe, die für die konventionelle, mechanische-Homogenisierung verwendet wurde (fünffache Vergrößerung). a: humane Tonsille Nr. 1. b: humane Tonsille Nr. 2. c: humane Tonsille Nr. 3.

#### 7.4.3.1 Vergleich von Proteinextrakte mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese

Die Gele der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2DE) der humanen Tonsille Nr. 1 (Abbildung 31) zeigten mehrere Protein-Spots, die sowohl im Gel der MH als auch im Gel der DH detektiert und identifiziert werden konnten, sowie deutliche Unterschiede (Tabelle 6). Der deutlichste Unterschied wurde zwischen einem isoelektrischen Punkt von pH 7 und pH 9 und einer Molekülmasse von 30 kDa bis 58 kDa beobachtet (Abbildung 31, Rechteck und vergrößerte Bereiche). In dem entsprechenden Bereich wurden vier Spots detektiert (Spot-Nr. \*9-\*12 (MH), 9-12 (DH)), welche im Gel des DH und im Gel des MH vorhanden waren. Die Spots wurden in der LC-MS/MS-Analyse als Pyruvat Kinase PKM (Gen: PKM, m= 57,9 kDa, Spot-Nr. \*9 (MH), 9 (DH)), als Annexin A2 (Gen: ANXA2, m= 38,6 kDa, Spot-Nr.\*10 (MH), 10 (DH)), als L-Lactat Dehydrogenase A Kette (Gen: LDHA, m= 36,7 kDa, Spot-Nr. \*11 (MH), 11 (DH)) und als das spannungsabhängige Anion selektive Kanalprotein 1 (VDAC1, 30,8 kDa, Spot-Nr.\*12 (MH), 12 (DH)) identifiziert (Tabelle 6). Neben diesen Spots zeigte das 2DE-Gel des DH mehrere Spots und Spot-Ketten, die im 2DE des MH nicht identifiziert werden konnten. Die Kette, bestehend aus den Spots Nr. 13-22 sowie der Spot Nr. 26 wurden durch verschiedene Proteinspezies des Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Gens (Gen: GAPDH, m= 36 kDa) hervorgerufen (Abbildung 31, Tabelle 6). Insgesamt wurden im 2DE-Gel des DH 11 verschiedene Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Spezies identifiziert. Im Gel des MH wurde mit dem Spot-Nr. \*13 eine Proteinspezies der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Gens identifiziert (Tabelle 6).

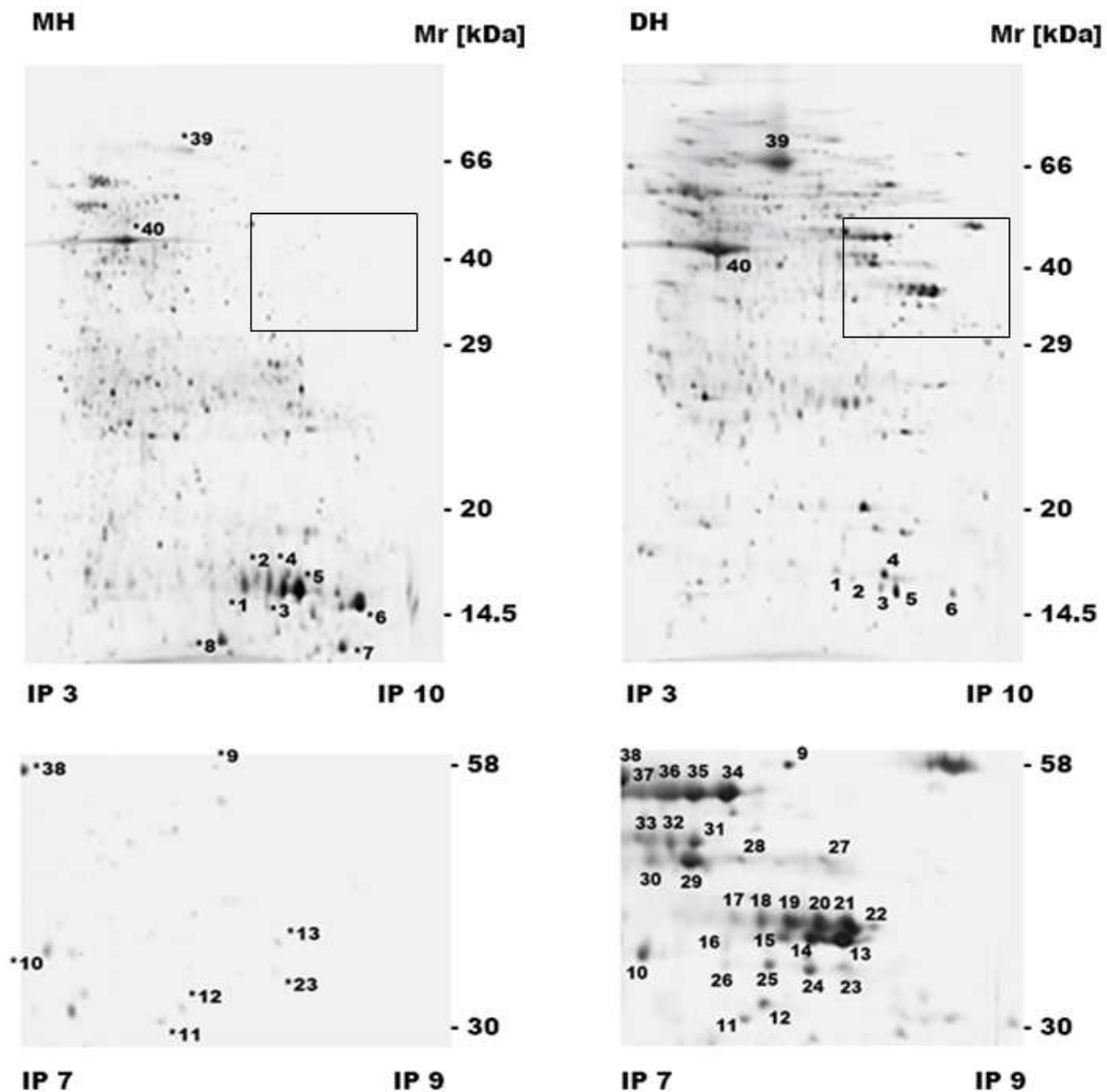
Darüber hinaus wurden im 2DE-Gel des DH vier verschiedene Proteinspezies für das Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1-Gen (Gen: HNRNPA2B1, m= 37,7 kDa, Abbildung 31, DH Spot-Nr. 22-25, Tabelle 6) und zwei Spezies des mitochondrialen Malatdehydrogenase-Gens (Gen: MDH2, m= 35,5 kDa, Abbildung 31, DH Spot-Nr. 23-24, Tabelle 6) identifiziert. Im Gel des MH wurde sowohl für das Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1- als auch für das mitochondriale Malatdehydrogenase-Gen jeweils eine Proteinspezies identifiziert (Abbildung 31, MH Spot-Nr. \*23, Tabelle 6).

Oberhalb der Spots-Kette der unterschiedlichen Spezies des Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Gens zeigte das 2DE-Gel des DH fünf Spots (Abbildung 31, DH Spot-Nr. 27-31), welche im 2DE-Gel des MH nicht nachgewiesen werden konnten. In Spot-Nr. 27 wurde die

Fructose-bisphosphat Aldolase A (Gen: ALDOA, m= 39,4 kDa) identifiziert und in Spot-Nr. 32 der mitochondriale Elongationsfaktor TU (Gen: TUFM, m= 49,5 kDa) (Tabelle 6). In den Spots 28-31 wurden verschiedene Proteinspezies des Phosphoglyceratkinase 1- Gens (Gen: PGK1, m= 44,6 kDa) identifiziert (Tabelle 6). In dem Ausschnitt des 2DE-Gels des DH konnte eine weitere Spot-Kette detektiert werden (Abbildung 31, DH Spot-Nr. 34-38), wohingegen in dem entsprechenden Bereich des MH ein einzelner Spot identifiziert wurde (Abbildung 31, MH Spot-Nr. \*38). Die LC-MS/MS-Analyse ergab, dass die Spots im 2DE-Gel des DH durch verschiedene Proteinspezies des Alpha-Enolase- (Gen: ENO1, m= 47,1 kDa, Spot-Nr. 34-38, Tabelle 6), des Beta-Enolase- (Gen: ENO3, m= 47 kDa, Spot-Nr. 34-38, Tabelle 6) und des Gamma-Enolase-Gens (Gen: ENO2, m= 47,3 kDa, Spot-Nr. 34, Tabelle 6) hervorgerufen wurden. In dem Spot der 2DE-Analyse des MH wurde eine Proteinspezies des Beta-Enolase-Gens identifiziert (Spot-Nr. \*38, Tabelle 6).

Im Molekülmassenbereich kleiner 20 kDa wurden auf dem 2DE-Gel des MH zwischen den isoelektrischen Punkten pH 6 und pH 7 acht intensive Spots detektiert (Abbildung 31, MH Spot-Nr. \*1-\*8). Die LC-MS/MS-Analyse der Spots ergab, dass diese durch verschiedene Proteinspezies des Hämoglobin Untereinheit Alpha- (Gen: HBA, m= 15,2 kDa, Spot-Nr. \*6-\*7), des Hämoglobin Untereinheit Beta- (Gen: HBB, m= 16 kDa, Spot-Nr. \*1-\*5, \*8), des Hämoglobin Untereinheit Delta- (Gen: HBD, m= 16 kDa, Spot-Nr. \*2-\*5, \*8) und des Profilin-Gens (Gen: PFN1, m= 15 kDa, Spot-Nr. \*1, \*4) hervorgerufen wurden (Tabelle 6). In den Spots mit der Nr. \*7 und der Nr. \*8 wurden Spezies des HBA- und HBB-Gens identifiziert, die eine Molekülmasse von kleiner 10 kDa besaßen. Darüber hinaus wurden im Spot Nr. 6 Proteinspezies verschiedener Myosin-Gene identifiziert, die eine Molekülmasse von weniger als 20 kDa besaßen.

Das 2DE-Gel des DH zeigte in dem entsprechenden Bereich sechs Spots (Abbildung 31, DH Spot-Nr. 1-6). In der LC-MS/MS-Analyse wurden insgesamt fünf Spezies des HBB-Gens (Spot-Nr. 1-5), vier Spezies des HBD-Gens (Spot-Nr. 2-5), zwei Spezies des Profilin-Gens (Spot-Nr. 1, 4) und eine Spezies für das HBA-Gen (Spot-Nr. 6) identifiziert (Tabelle 6). Im Vergleich zum MH-2DE-Gel wurden im DH-2DE-Gel keine Proteinspezies des HBA- und HBB-Gens identifiziert mit einer Molekülmasse kleiner 10 kDa sowie keine Myosin-Proteinspezies mit einer Molekülmasse kleiner 20 kDa.



**Abbildung 31: Zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE) der humanen Tonsille Nr. 1 nach mechanischer Homogenisierung (MH) und PIRL-Ablation (PIRL-DIVE-Homogenat, DH).** MH: 2DE des Proteinextrakts der mechanischen Homogenisierung (MH, m= 200 µg). DH: MH: 2DE des Proteinextrakts der PIRL-Ablation (PIRL-DIVE-Homogenisierung, DH, m= 200 µg). Die Spots, die in der LC-MS/MS-Analyse identifiziert wurden und im Text sowie in Tabelle 6 beschrieben sind, sind mit einer Ziffer (DH) oder mit einem Stern und einer Ziffer markiert (MH). Die Rechtecke markieren die Bereiche der 2DE-Gele, die im unteren Bereich der Abbildung vergrößert abgebildet sind.

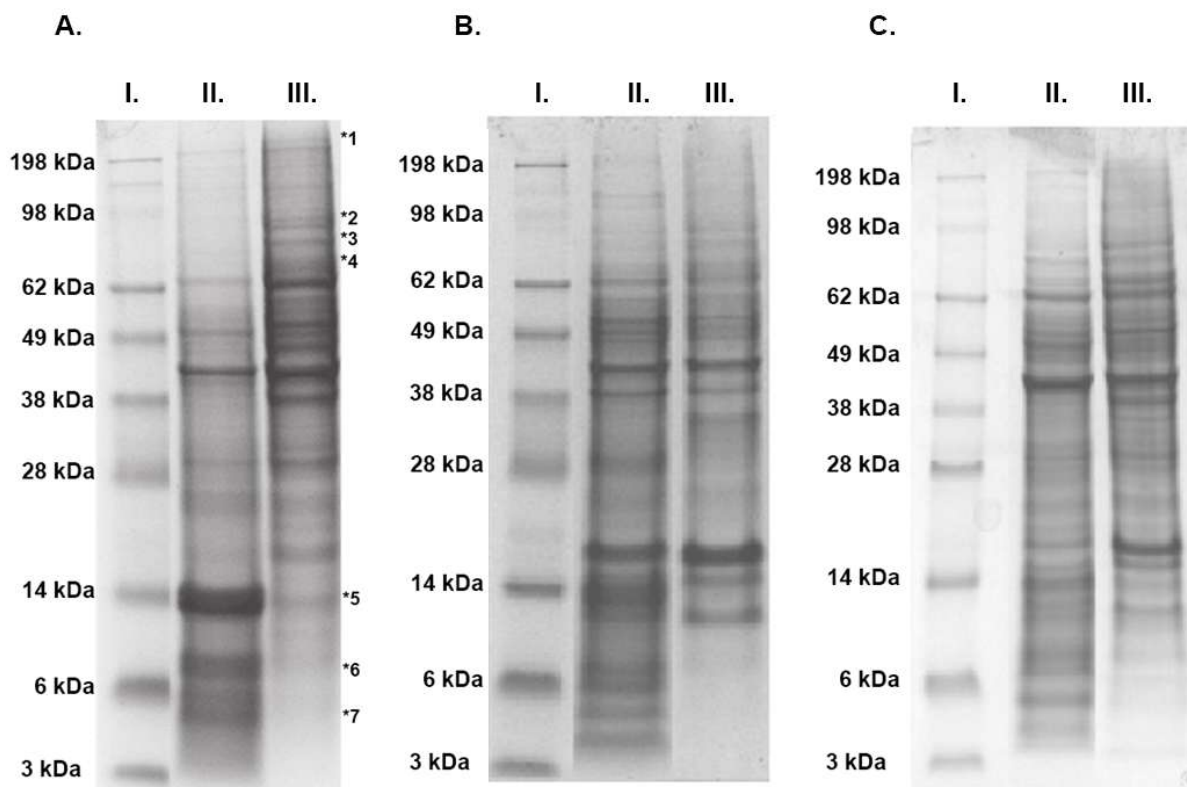
**Tabelle 6: Proteinidentifizierungen ausgewählter Spots der zweidimensionalen Gelelektrophorese der Proteinextrakte der PIRL-Ablation (PIRL-DIVE-Homogenisierung, DH) und des mechanischen Homogenats (MH) der humanen Tonsille (Abbildung 31). X: Spot war nicht präsent im Gel der 2DE**

Protein	Spot Nr. DH	Spot Nr. MH
Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA PE=1 SV=2	6	*6, *7
Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2	1-5	*1-*5; *8
Hemoglobin subunit delta OS=Homo sapiens GN=HBD PE=1 SV=2	2-3, 5	*2-*3, *5
Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2	1, 4	*1, *4
Myosin-7 OS=Homo sapiens GN=MYH7 PE=1 SV=5	X	*6
Myosin-1 OS=Homo sapiens GN=MYH1 PE=1 SV=3	X	*6
Myosin-2 OS=Homo sapiens GN=MYH2 PE=1 SV=1	X	*6
Myosin-4 OS=Homo sapiens GN=MYH4 PE=1 SV=2	X	*6
Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens GN=PKM PE=1 SV=4	9	*9
Annexin A2 OS=Homo sapiens GN=ANXA2 PE=1 SV=2	10	*10
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Homo sapiens GN=VDAC1 PE=1 SV=2	11	*11
L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens GN=LDHA PE=1 SV=2	12	*12
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3	13-22, 26	*13
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=2	22-25	*23
Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MDH2 PE=1 SV=3	23-24	*23
Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Homo sapiens GN=ALDOA PE=1 SV=2	27	X
Phosphoglycerate kinase 1 OS=Homo sapiens GN=PGK1 PE=1 SV=3	28-31	X
Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=TUFM PE=1 SV=2	32-33	X
Actin, aortic smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA2 PE=1 SV=1	33	X
alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2	34-38	X
beta-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO3 PE=1 SV=5	34-38	*38
gamma-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO2 PE=1 SV=3	34	X
Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	39	*39
Actin, alpha skeletal muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA1 PE=1 SV=1	40	*40
Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Homo sapiens GN=ACTC1 PE=1 SV=1	40	*40
Actin, aortic smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA2 PE=1 SV=1	40	*40
Actin, gamma-enteric smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTG2 PE=1 SV=1	40	*40



### 7.4.3.2 Vergleich der Proteinzusammensetzung mit der eindimensionalen Gelelektrophorese

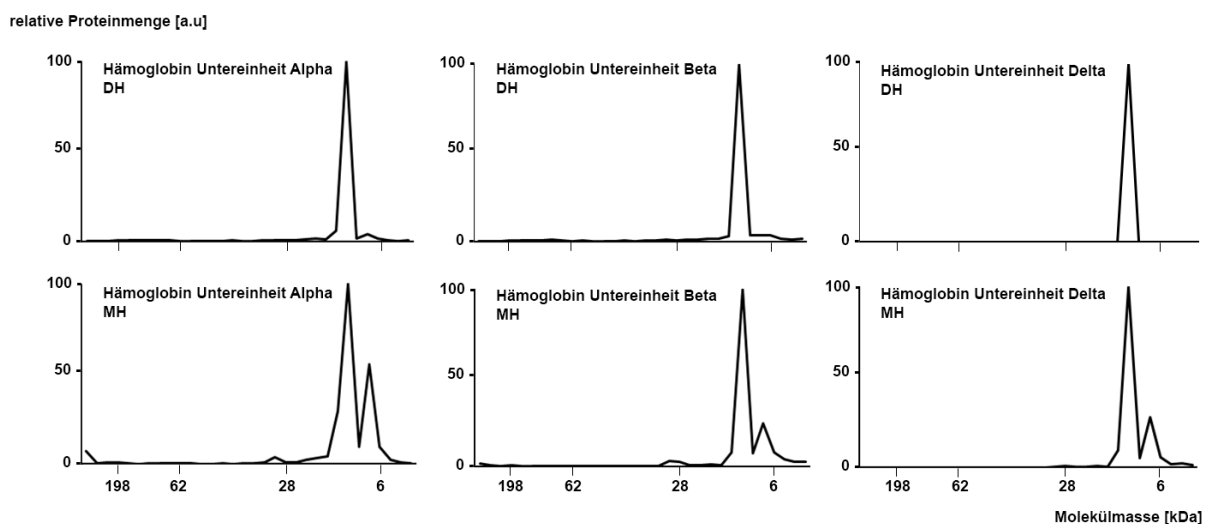
Für die massenspektrometrische Analyse wurden die Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) der drei biologischen Replikate (Abbildung 32) in vergleichbare Banden unterteilt (Abbildung 49, Anhang) und tryptisch verdaut. Die Gelelektrophoresen der mechanischen Homogenate (MH, Abbildung 32 A bis Abbildung 32 C, II.) zeigten im niedermolekularen Bereich ( $m < 20$  kDa) eine deutlich intensivere Färbung als die Gelelektrophoresen der PIRL-DIVE-Homogenisierung (DH, Abbildung 32 A bis Abbildung 32 C, III.).



**Abbildung 32: SDS-PAGE der Proteinextrakte der humanen Tonsillen nach konventioneller, mechanischer Homogenisierung (II.) und der PIRL-Ablation (PIRL-DIVE-Homogenisierung) (III.)** A: SDS-PAGE der humanen Tonsille Nr. 1. I: Proteinstandard. II: Proteinextrakt des konventionellen, mechanischen Homogenats (MH,  $m = 40 \mu\text{g}$ ). III: Proteinextrakt des PIRL-DIVE-Homogenats (DH,  $m = 40 \mu\text{g}$ ). B: SDS-PAGE der humanen Tonsille Nr. 2. I: Proteinstandard. II: Proteinextrakt des konventionellen, mechanischen Homogenats (MH,  $m = 40 \mu\text{g}$ ). III: Proteinextrakt des PIRL-DIVE-Homogenats (DH,  $m = 40 \mu\text{g}$ ). C: SDS-PAGE der humanen Tonsille Nr. 3. I: Proteinstandard. II: Proteinextrakt des konventionellen, mechanischen Homogenats (MH,  $m = 40 \mu\text{g}$ ). III: Proteinextrakt des PIRL-DIVE-Homogenats (DH,  $m = 40 \mu\text{g}$ ). Mit einem Stern markierte Ziffer: Banden der SDS-PAGE der Tonsille Nr. 1, die im Text genauer beschrieben werden.



Die LC-MS/MS-Analyse der Bande der MH-Gelelektrophorese auf Höhe der 14 kDa-Markerbande (Abbildung 32 A, \*5) zeigte, dass die Bande von drei verschiedenen Hämoglobin-Proteinen hervorgerufen wurde (Hämoglobin Untereinheit Alpha, Gen: HBA,  $m = 15,2$  kDa; Hämoglobin Untereinheit Beta, Gen: HBB,  $m = 16$  kDa; Hämoglobin Untereinheit Delta, Gen: HBD,  $m = 16,1$  kDa). Die Proteine HBA, HBB und HBD konnten in der DH-Gelelektrophorese ebenfalls auf Höhe der 14 kDa-Markerbande identifiziert werden. Die zwei Banden ober- und unterhalb der 6 kDa-Markerbande (Abbildung 32 A, \*6, \*7) in der Gelelektrophorese des MH wurden von Proteinspezies der Hämoglobin-Gene HBA, HBB und HBD verursacht, die eine geringere Molekülmasse besaßen als die Proteinspezies, die theoretisch nach der Synthese des entsprechenden Gens entstehen sollte (Vollängen-Proteinspezies). In der Gelelektrophorese des DH wurde in der schwach gefärbten Bande knapp oberhalb der 6 kDa-Markerbande das 10 kDa Hitzeschockprotein (Gen: HSPE1,  $m = 10,9$  kDa) identifiziert. Für die Proteinspezies der Hämoglobin-Gene HBA, HBB und HBD wurden Gelelektrophorese-Migrationsprofile erstellt, indem die relative Menge der Proteinspezies gegen die Molekülmasse entsprechend der Position in der Gelelektrophorese des MH und DH aufgetragen wurden (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Gelelektrophorese-Migrationsprofile für Proteinspezies unterschiedlicher Größe der Gene Hämoglobin Untereinheit Alpha, -Beta und -Delta der SDS-PAGE der humanen Tonsille Nr. 1.** DH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil der PIRL-Ablation. MH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil des Homogenats, gewonnen durch konventionelle Homogenisierung. Ordinate: relative Proteinmenge [a.u.]. Abszisse: Molekülmasse [kDa].

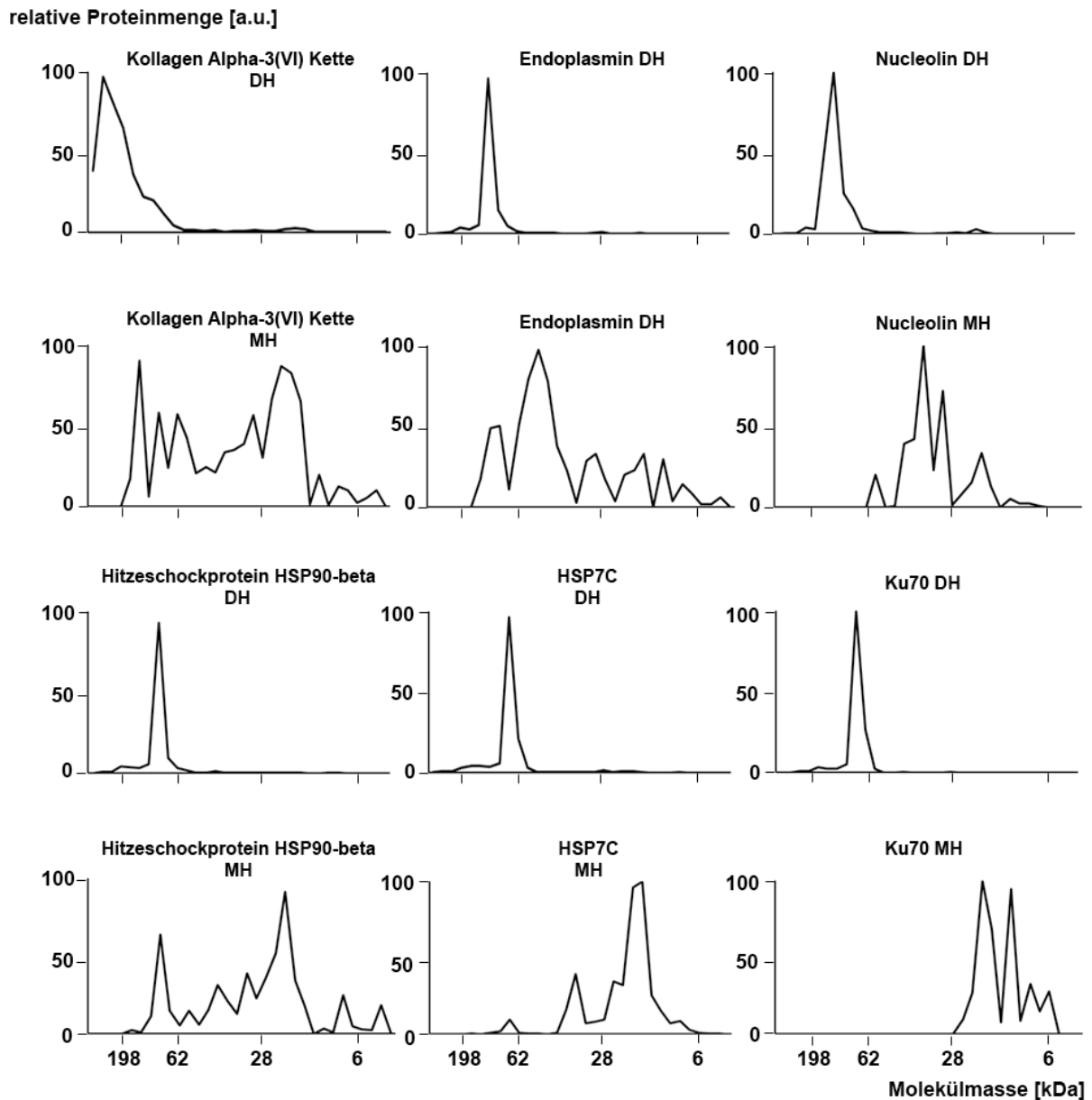
Die Gelelektrophorese-Migrationsprofile des DH zeigten, dass für die Hämoglobin-Gene HBA, HBB und HBD nahezu ausschließlich Proteinspezies mit einer Molekülmasse von ungefähr 14 kDa identifiziert wurden. Die Gelelektrophorese-Migrationsprofile des MH zeigten für die Hämoglobin-Gene HBA, HBB und HBD Proteinspezies mit einer Molekülmasse von ungefähr 14 kDa. Darüber hinaus wurden für alle drei Hämoglobin-Gene Proteinspezies mit einer Molekülmasse von etwas mehr als 6 kDa identifiziert. Die Gelelektrophorese-Migrationsprofile der verschiedenen Hämoglobin-Proteinspezies der humanen Tonsille Nr. 2 und Nr. 3 ergaben ähnliche Resultate (Abbildung 50 bis Abbildung 52, Anhang).

In den Gelelektrophoresen der DH-Homogenate wurden oberhalb von 30 kDa mehrere Banden detektiert, die in der Gelelektrophorese des MH entweder nicht vorhanden waren oder eine weniger intensive Färbung zeigten. Die LC-MS/MS-Analyse ergab, dass die Bande knapp oberhalb der 198 kDa-Markerbande (Abbildung 32 A, \*1) durch das Kollagen-Protein Kollagen Alpha-3(VI) Kette (Gen: COL6A3, m= 343,7 kDa) hervorgerufen wurde. In der Gelelektrophorese des MH konnte in dem entsprechenden Bereich keine Bande beobachtet werden und die LC-MS/MS-Analyse des entsprechenden Bereichs führte zu keiner Identifizierung des Kollagen-Proteins. Für die Proteinspezies des COL6A3-Gens wurden Gelelektrophorese-Migrationsprofile erstellt (Abbildung 34). Anhand der Gelelektrophorese-Migrationsprofile konnte festgestellt werden, dass in der Gelelektrophorese des DH nahezu ausschließlich Proteinspezies des COL6A3-Gens mit Molekülmassen größer 200 kDa und in der MH-Gelelektrophorese Proteinspezies mit Molekülmasse zwischen 198 kDa und 3 kDa identifiziert wurden. Die MH-Gelelektrophorese-Migrationsprofile der Proteinspezies des COL6A3-Gens der humanen Tonsille Nr. 2 und Nr. 3 zeigten, dass Spezies mit Molekülmassen größer 200 kDa (Abbildung 53, Anhang) sowie eine Vielzahl von Proteinspezies mit Molekülmassen zwischen 198 kDa und 3 kDa in dem MH identifiziert wurden. Das Gelelektrophorese-Migrationsprofil der Proteinspezies des COL6A3-Gens der DH-Gelelektrophorese der humanen Tonsille Nr. 3 zeigte, dass weitestgehend Spezies mit Molekülmassen größer 200 kDa identifiziert wurden (Abbildung 53, Anhang). Das DH-Gelelektrophorese-Migrationsprofil der humanen Tonsille Nr. 2 zeigte, dass hauptsächlich COL6A3-Spezies mit Molekülmassen größer 200 kDa identifiziert wurden. Darüber hinaus konnten im DH-Gelelektrophorese-Migrationsprofil der humanen Tonsille Nr. 2 Proteinspezies des COL6A3-Gens mit Molekülmassen zwischen 62 kDa und 98 kDa sowie mit Molekülmassen von ungefähr 20 kDa identifiziert werden (Abbildung 53, Anhang).

In der Gelelektrophorese des DH konnten unterhalb der 98 kDa-Markerbande zwei Banden identifiziert werden (Abbildung 32 A, \*2), die in der MH-Gelelektrophorese nicht vorhanden waren (Abbildung 32 A, \*2). Die LC-MS/MS-Analyse ergab, dass die obere der zwei Banden durch das Protein Endoplasmin (Gen: HSP90B1, m= 92,5 kDa) und die untere durch das Hitzeschockprotein HSP90-Beta (Gen: HSP90AB1, m= 82,3 kDa) hervorgerufen wurde. Sowohl Endoplasmin als auch HSP90-Beta konnten in der LC-MS/MS-Analyse der Gelelektrophorese des MH unterhalb der 98 kDa-Markerbande identifiziert werden. Für die Proteinspezies des Endoplasmin-Gens und die Spezies des HSP90-Beta-Gens wurden ebenfalls Gelelektrophorese-Migrationsprofile erstellt (Abbildung 34). Anhand der Gelelektrophorese-Migrationsprofile des DH konnte festgestellt werden, dass sowohl für das Endoplasmin- als auch für das HSP90-Beta-Gen nahezu ausschließlich Proteinspezies identifiziert wurden, die mit der theoretischen Molekülmasse des Endoplasmin- bzw. HSP90-Beta-Gens nach der Proteinsynthese (Vollängen-Proteinspezies) gut übereinstimmten. Die Gelelektrophorese-Migrationsprofile des MH zeigten neben den Vollängen-Proteinspezies eine Vielzahl von Endoplasmin- und HSP90-Beta-Spezies, deren Molekülmassen sich von der Molekülmasse der Vollängen-Spezies des Endoplasmin- bzw. HSP90-Beta -Gens bis zu einer Molekülmasse kleiner 6 kDa erstreckten. Die Gelelektrophorese-Migrationsprofile der DH- und MH-Gelelektrophorese der humanen Tonsille Nr. 2 und Nr. 3 zeigten ein ähnliches Ergebnis. In den Gelelektrophorese-Migrationsprofilen der DH-Gelelektrophoresen wurden sowohl für das Endoplasmin- als auch für das HSP90-Beta-Gen weitestgehend Vollängen-Proteinspezies identifiziert (Abbildung 54 und Abbildung 55, Anhang). In den Gelelektrophorese-Migrationsprofile der MH-Gelelektrophoresen wurden für das Endoplasmin- und das HSP90-Beta-Gen ebenfalls Proteinspezies identifiziert, deren Molekülmassen mit der theoretischen Molekülmasse der Vollängen-Proteinspezies gut übereinstimmten. Darüber hinaus zeigten die MH-Gelelektrophorese-Migrationsprofile sowohl für das Endoplasmin- und als auch für das HSP90-Beta-Gen eine Vielzahl von Proteinspezies, deren Molekülmassen kleiner waren als die der jeweiligen Vollängen-Proteinspezies und sich bis zu einer Molekülmasse von 6 kDa erstreckten (Abbildung 54 und Abbildung 55, Anhang).

Für die Proteine Nucleolin (Gen: NCL, m= 76,6 kDa, Abbildung 32 A, \*3), HSP7C (heat shock cognate 71 kDa protein, Gen: HSPA8 m= 70,9 kDa, Abbildung 32 A, \*4) und Ku70 (Gen: XRCC6, m= 69,9 kDa, Abbildung 32 A, \*4) wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. Für das Nucleolin-, das HSP7C- und das Ku70-Gen wurden in der Gelelektrophorese des DH nahezu

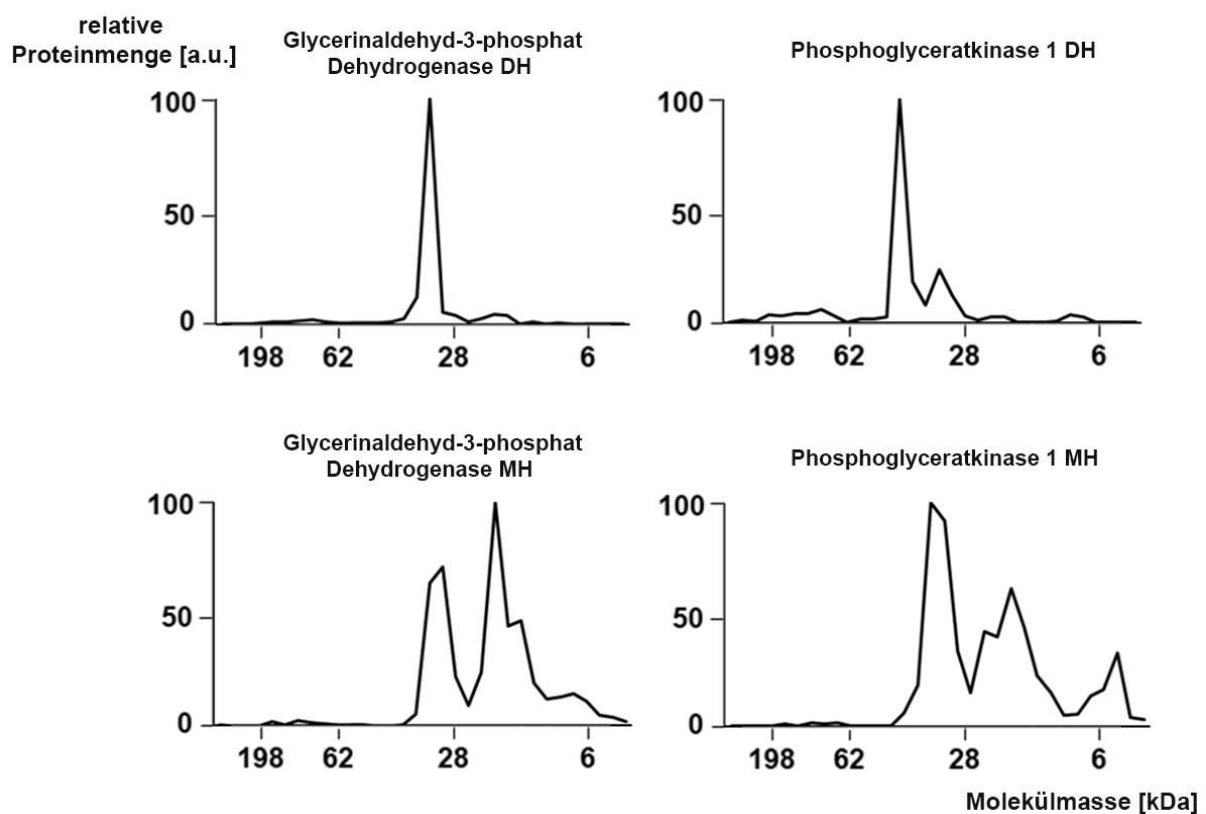
ausschließlich Vollängen-Proteinspezies identifiziert (Abbildung 34). In der Gelelektrophorese des MH konnte sowohl für das Ku70- als auch für das Nucleolin-Gen keine Vollängen-Proteinspezies identifiziert werden. Für das Nucleolin-Gen wurden Proteinspezies identifiziert, deren Molekülmassen 62 kDa bis 8 kDa betragen. Für das Ku70-Gen wurden Proteinspezies identifiziert deren Molekülmassen zwischen 28 kDa und kleiner 3 kDa lagen. Das Gelelektrophorese-Migrationsprofil der DH-Gelelektrophorese des DH (Abbildung 34) zeigte für das HSP7C-Gen hauptsächlich Vollängen-Proteinspezies mit einer Molekülmasse von ungefähr 71 kDa sowie in sehr geringen Mengen Proteinspezies mit einer Molekülmasse größer 71 kDa. Das Gelelektrophorese-Migrationsprofil der MH-Gelelektrophorese zeigte sowohl Vollängen-Spezies des HSP7C-Gens als auch Spezies mit einer Molekülmasse zwischen 50 kDa und 8 kDa. Hierbei kamen die Vollängen-Spezies ( $m \sim 71$  kDa) in einer deutlich geringeren Menge vor als die Spezies mit einer Molekülmasse kleiner 30 kDa. Die Gelelektrophorese-Migrationsprofile für die Proteinspezies des Nucleolin-, HSP7C und Ku70-Gens der DH- und MH-Gelelektrophorese der humanen Tonsille Nr. 2 und Nr. 3 lieferten ein ähnliches Ergebnis. In den DH-Gelelektrophorese-Migrationsprofilen wurden für das Nucleolin-, das HSP7C- und das Ku70-Gen nahezu ausschließlich Vollängen-Proteinspezies identifiziert (Abbildung 56 bis Abbildung 58, Anhang). Während in den MH-Gelelektrophorese-Migrationsprofilen ebenfalls Vollängen-Proteinspezies für das Nucleolin-, HSP7C- und Ku70-Gen identifiziert werden konnten, wurde für alle drei Gene eine Vielzahl von Proteinspezies nachgewiesen, deren Molekülmassen deutlich kleiner waren als die der jeweiligen Vollängen-Proteinspezies (Abbildung 56 bis Abbildung 58, Anhang). Für das Nucleolin-Gen wurden Proteinspezies mit Molekülmassen bis zu weniger als 20 kDa identifiziert (Abbildung 56, Anhang) und für HSP7 und Ku70 konnten Proteinspezies mit Molekülmassen bis hinunter zu 6 kDa identifiziert werden (Abbildung 57 und Abbildung 58, Anhang).



**Abbildung 34: Gelelektrophorese-Migrationsprofile für Proteinspezies unterschiedlicher Größe verschiedener Protein kodierender Gene der SDS-PAGE der humanen Tonsille Nr. 1.** DH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil der PIRL-Ablation. MH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil des Proteinextrakts der konventionellen, mechanischen Homogenisierung. Ordinate: relative Proteinmenge [a.u.]. Abszisse: Molekülmasse [kDa].

Für die Proteine Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (Gen: GAPDH,  $m = 36,1$  kDa) und Phosphoglyceratkinase 1 (Gen: PGK1,  $m = 44,6$  kDa) wurden ebenfalls Gelelektrophorese-Migrationsprofile erstellt (Abbildung 35). In der Gelelektrophorese des DH wurden fast ausschließlich Vollängen-Proteinspezies des Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase-Gens mit einer Molekülmasse von 36 kDa identifiziert. In dem Gelelektrophorese-Migrationsprofil des MH konnten ebenfalls Vollängen-Proteinspezies des Glycerinaldehyd-3-

phosphat Dehydrogenase-Gens identifiziert werden. Darüber hinaus wurde im MH eine Vielzahl von Spezies detektiert, deren Molekülmasse kleiner waren als die der Volllängen-Proteinspezies des Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase-Gens. Der Großteil der Spezies besaß eine Molekülmasse von weniger als 28 kDa und es wurden Spezies identifiziert, die eine Molekülmasse kleiner 6 kDa besaßen. Die Gelelektrophorese-Migrationsprofile der humanen Tonsille Nr.3 lieferten ein nahezu identisches Ergebnis (Abbildung 59, Anhang) und für die humane Tonsille Nr. 2 wurden sowohl im DH- als auch im MH-Gelelektrophorese-Migrationsprofil nahezu ausschließlich Volllängen-Proteinspezies des Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase-Gens detektiert (Abbildung 59, Anhang).



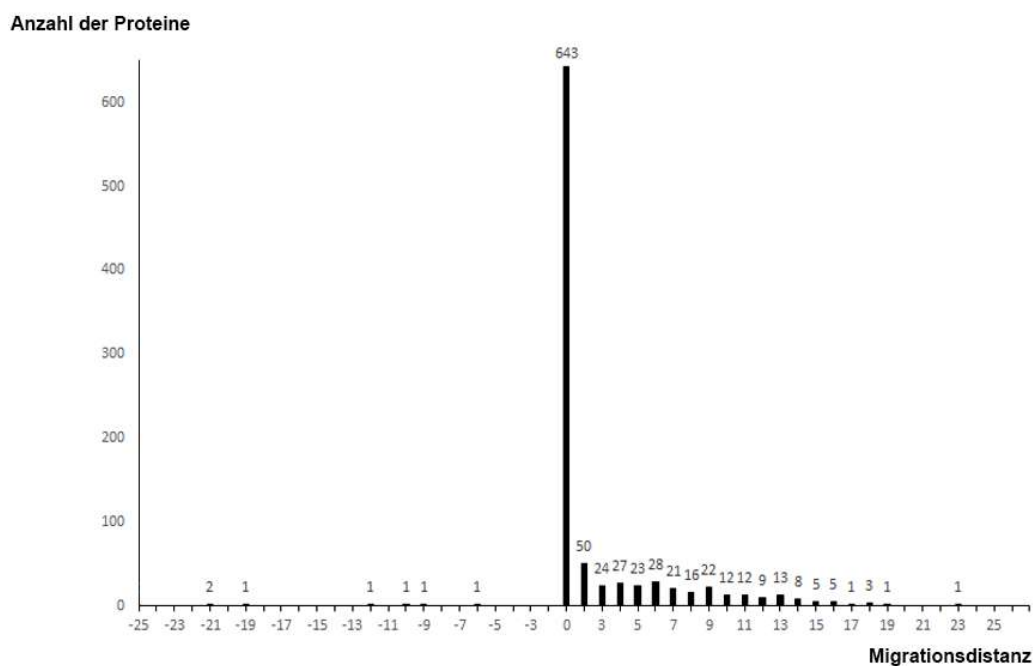
**Abbildung 35: Gelelektrophorese-Migrationsprofile für Proteinspezies des Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase-Gens (GAPDH) und des Phosphoglyceratkinase-1-Gens (PGK1) der SDS-PAGE der humanen Tonsille Nr. 1.** DH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil des Proteinextrakts der PIRL-DIVE-Homogenisierung. MH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil über die Gelelektrophorese des Proteinextrakts der konventionellen, mechanischen Homogenisierung. Abszisse: Relative Molekularmasse,  $M_r$  [kDa]. Ordinate: relative Proteinintensität [a.u.].

Für das Protein Phosphoglyceratkinase 1 wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet. Das Gelelektrophorese-Migrationsprofil des DH (Abbildung 35) zeigte, dass der Großteil der Spezies des Phosphoglyceratkinase 1-Gens eine Molekülmasse besaß, die mit der Molekülmasse der Vollängen-Proteinspezies des PGK1-Gens gut übereinstimmte. Darüber hinaus wurden in deutlich geringerer Menge Proteinspezies identifiziert, die eine Molekülmasse kleiner 36 kDa sowie größer 80 kDa besaßen. Im Vergleich hierzu zeigt das Gelelektrophorese-Migrationsprofil des MH, dass hauptsächlich Spezies des Phosphoglyceratkinase 1-Gens mit Molekülmassen von ungefähr 38 kDa, knapp unter 28 kDa und 6 kDa identifiziert wurden. Die MH- und DH-Gelelektrophorese-Migrationsprofile der zwei weiteren Tonsillen-Replikate (humane Tonsille Nr. 2 und Nr. 3) lieferten ähnliche Ergebnisse (Abbildung 60, Anhang).

Um zwischen der mechanischen Homogenisierung und der PIRL-DIVE-Homogenisierung einen relativen Grad der Proteolyse bestimmen zu können, wurden für die Proteine, die sowohl im MH als auch im DH identifiziert werden konnten, Gelelektrophorese-Migrationsprofile erstellt. In den Gelelektrophorese-Migrationsprofilen wurde für jedes Protein das Signal der abundantesten Spezies bestimmt. Anschließend wurde für die drei biologischen Replikate jeweils ein Histogramm erstellt (Abbildung 36 bis Abbildung 38). In den Histogrammen wurde die Verschiebung der abundantesten Proteinspezies zwischen der mechanischen Homogenisierung und der PIRL-DIVE-Homogenisierung dargestellt (SDS-PAGE-Migrationsverschiebungshistogramme). Wenn die abundanteste Proteinspezies eines Gens sowohl im MH- als auch im DH-Gelelektrophorese-Migrationsprofil in der gleichen (Migrationsverschiebung= 0) oder in der benachbarten Bande (Migrationsverschiebung= -1, +1) detektiert wurde, betrug die Migrationsdistanz 0. Eine Migrationsdistanz von 0 bedeutete, dass für die abundanteste Proteinspezies zwischen MH und DH keine Migrationsverschiebung beobachtet wurde. Eine Migrationsdistanz von größer-gleich 2 bedeutete, dass für die abundanteste Proteinspezies zwischen MH und DH eine Migrationsverschiebung zu niedrigeren Molekülmassen beobachtet wurde. Es wurde angenommen, dass die Migrationsverschiebung durch einen proteolytischen Abbau während der Probenaufarbeitung zustande gekommen ist.

Bei der humanen Tonsille Nr. 1 wurde für 643 Proteine eine Migrationsdistanz von 0 beobachtet (Abbildung 36; Tabelle 12, Anhang). Im Fall der mechanischen Homogenisierung

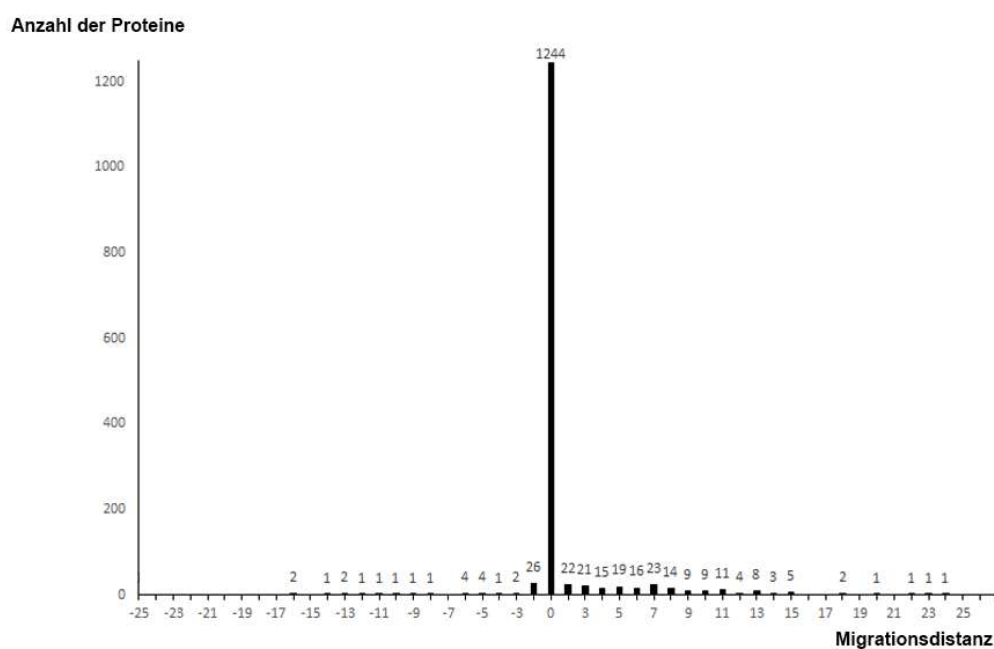
wurde für 281 Proteine eine Migrationsdistanz von größer-gleich 2 beobachtet und im Fall der PIRL-DIVE-Homogenisierung wurde für insgesamt 7 Proteine eine Migrationsdistanz von größer-gleich 2 festgestellt (Abbildung 36; Tabelle 12 Anhang). Der relative Grad der Proteolyse betrug dementsprechend für MH 30,18% und für DH 0,75% (Tabelle 13, Anhang). Für die humane Tonsille Nr. 2 wurde für 1244 Proteinen eine Migrationsdistanz von 0 detektiert (Abbildung 37; Tabelle 12 Anhang). Das Migrationsverschiebungshistogramm zeigte im Fall des MH für 185 und im Fall des DH für 47 Proteine eine Migrationsdistanz von größer-gleich 2. Der relative Grad der Proteolyse betrug bei der zweiten Tonsille für MH 12,53% und für DH 3,19% (Tabelle 13, Anhang). Für die humane Tonsille Nr. 3 zeigte das Histogramm der Migrationsverschiebung für 1258 Proteinen eine Migrationsdistanz von 0 (Abbildung 38; Tabelle 12 Anhang). Für MH wurde bei 415 Proteinen und für DH wurde bei 31 Proteinen eine Migrationsdistanz von größer-gleich 2 festgestellt (Abbildung 38; Tabelle 12 Anhang). Der relative Grad der Proteolyse betrug für die dritte Tonsille bei MH 24,35% und bei DH 1,82% (Tabelle 13, Anhang).



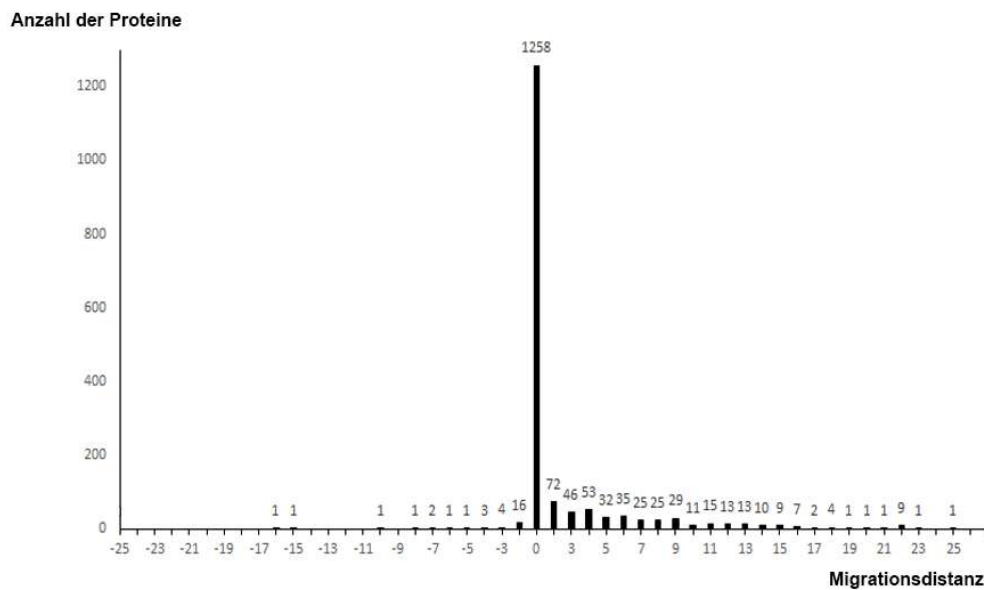
**Abbildung 36: SDS-PAGE-Migrationsverschiebungshistogramm der Proteine der humanen Tonsille Nr. 1.** Das Histogramm zeigt die relative Migrationsverschiebung der abundantesten Proteinspezies eines Gens in den Gelelektrophorese-Migrationsprofilen der Proteine, die sowohl im Homogenat der PIRL-Ablation (DH, negative Migrationsdistanz) als auch im Homogenat der mechanischen Homogenisierung (MH, positive Migrationsdistanz) identifiziert wurden.



Die Analyse der Migrationsverschiebung ergab einen durchschnittlichen Grad der relativen Proteolyse von 1,92% (+/- 1,22%) für die PIRL-DIVE-Homogenisierung und von 22,41% (+/- 9,01%) für die mechanische Homogenisierung (Abbildung 39, Tabelle 13). Die Ergebnisse zeigten, dass in den Homogenaten der PIRL-Ablation im Vergleich zu den konventionellen, mechanischen Homogenaten ein signifikant niedrigerer Grad der Proteolyse detektiert wurde (T-Test:  $p=0,018$ ).

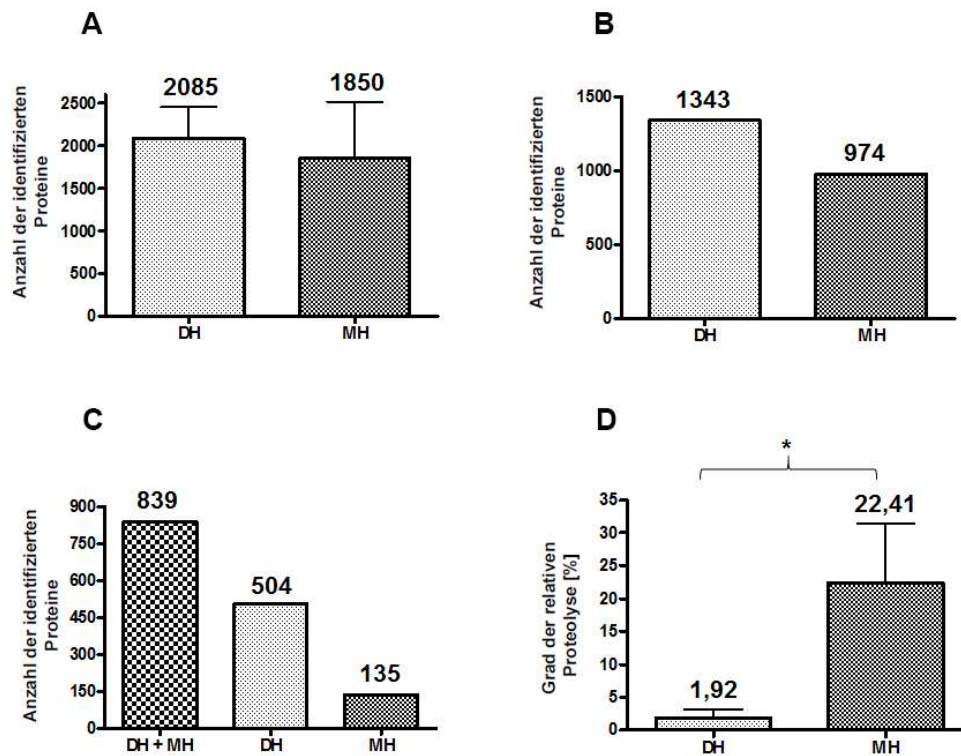


**Abbildung 37: SDS-PAGE-Migrationsverschiebungs-Histogramm der Proteine der humanen Tonsille Nr. 2.** Das Histogramm zeigt die relative Migrationsverschiebung der abundantesten Proteinspezies eines Gens in den Gelelektrophorese-Migrationsprofilen der Proteine, die sowohl im Homogenat der PIRL-Ablation (DH, negative Migrationsdistanz) als auch im Homogenat der mechanischen Homogenisierung (MH, positive Migrationsdistanz) identifiziert wurden.



**Abbildung 38: SDS-PAGE-Migrationsverschiebungs-Histogramm der Proteine der humanen Tonsille Nr. 3.** Das Histogramm zeigt die relative Migrationsverschiebung der abundantesten Proteinspezies eines Gens in den Gelelektrophorese-Migrationsprofilen der Proteine, die sowohl im Homogenat der PIRL-Ablation (DH, negative Migrationsdistanz) als auch im Homogenat der mechanischen Homogenisierung (MH, positive Migrationsdistanz) identifiziert wurden.

In den Banden der DH- und MH-SDS-PAGE der drei humanen Tonsillen konnten im Durchschnitt 2085 Proteine (+/ 366 Proteine, DH) bzw. 1850 Proteine (+/ 667 Proteine, MH) identifiziert werden (Abbildung 39 A; Tabelle 14, Anhang). Bei der PIRL-DIVE-Homogenisierung wurden insgesamt 1343 Proteine in allen drei biologischen Replikaten identifiziert und bei der mechanischen Homogenisierung insgesamt 974 Proteine (Abbildung 39 B). Ein Vergleich der Proteine, die in allen drei biologischen Replikaten identifiziert werden konnten, ergab folgendes Ergebnis. Es wurden insgesamt 839 Proteine (56,8%) sowohl in den Homogenaten der PIRL-Ablation als auch in den Homogenaten der mechanischen Homogenisierung identifiziert. Insgesamt 134 Proteine (9,1%) wurden ausschließlich in den Homogenaten der mechanischen Homogenisierung identifiziert und 504 Proteine (34,1%) konnten ausschließlich in den Homogenaten der PIRL-Ablation identifiziert werden (Abbildung 39 C).



**Abbildung 39: Statistische Auswertung der Ergebnisse der LC-MS/MS-Messungen der Banden der SDS-PAGE der humanen Tonsille (n= 3) nach PIRL-DIVE-Homogenisierung (DH) und nach mechanischer Homogenisierung (MH).** A: Balkendiagramm (Mittelwert mit Standardabweichung) mit der Anzahl der Proteine, die in den drei biologischen Replikaten nach PIRL-DIVE-Homogenisierung (DH) und nach konventioneller, mechanischer Homogenisierung (MH) identifiziert wurden. B: Balkendiagramm mit der Anzahl der Proteine, die jeweils in allen drei biologischen Replikaten nach PIRL-DIVE-Homogenisierung (DH) und nach konventioneller, mechanischer Homogenisierung (MH) identifiziert wurden. C: Balkendiagramm mit der Anzahl der Proteine, die jeweils in allen drei biologischen Replikaten nach DIVE- und nach konventioneller, mechanischer Homogenisierung (DH+MH), jeweils ausschließlich nach PIRL-DIVE-Homogenisierung (DH) und jeweils ausschließlich nach konventioneller, mechanischer Homogenisierung (MH) identifiziert wurden. D: Balkendiagramm des relativen Grads der Proteolyse im PIRL-DIVE-Homogenat (DH) und im mechanischen Homogenat (MH). \*:  $p = 0,018$  (T-Test). Für eine Proteinidentifizierung mussten mindestens zwei verschiedene eindeutige Peptide für ein Protein identifiziert worden sein.

## 8 Diskussion

Jungblut et al. führten 1996 den Begriff der „Proteinspezies“ ein [4]. Bei der Proteinspezies handelt es sich um die kleinste funktionelle Einheit des Proteoms [8]. Eine individuelle Proteinspezies ist durch seine exakte chemische Zusammensetzung definiert [5]. Die exakte chemische Zusammensetzung einer Proteinspezies umfasst die gesamte Aminosäuresequenz und alle posttranslationalen Modifizierungen sowie nicht-kovalent gebundene Kofaktoren, wie z.B. Metallionen bei Metalloproteasen [46]. Die exakte chemische Zusammensetzung bestimmt die Funktion einer Proteinspezies. Eine Änderung der exakten chemischen Zusammensetzung führt zur Bildung einer neuen Proteinspezies, welche eventuell für die Ausbildung eines pathologischen Phänotyps mit verantwortlich sein kann. Die Typ III Variante des hereditären Angioödems (HAE-Typ III) wird zum Beispiel durch eine „Missense“-Mutation im F12-Gen hervorgerufen [47]. Hierdurch kommt es zur Bildung von Proteinspezies des F12-Gens (Protein: Faktor 12, FXII), die am Aminosäurerest 309 statt einem O-glykosylierten Threonin (Thr-309) ein Lysin (Lys-309) oder ein Arginin (Aminosäureaustausch: Arg-309) besitzen [48]. Die nicht glykosylierten Spezies (Lys309, Arg309) führen zu einer erhöhten Kontakt-induzierten Autoaktivierung des Faktor XII, wodurch es zu einer erhöhten Aktivierung des Kinin-Kallikrein-Systems kommt [49]. Der Großteil der aktuellen Proteomforschung ist von einem genzentrischen Konzept dominiert [50], das sich aus der Hypothese „ein Gen – ein Protein“ ableitet. Sowohl Wilhelm *et al.* [51] als auch Kim *et al.* [52] publizierten beispielsweise 2014 parallel in „Nature“ einen Gen-zentrischen Entwurf des humanen Proteoms. Wilhelm *et al.* identifizierten in ihrer Arbeit 18097 Proteine und verwiesen darauf, dass es Ihnen gelungen sei, 92% aller Proteine identifiziert zu haben. Der Ansatz von Wilhelm *et al.* berücksichtigte jedoch nicht, dass aus einem einzelnen proteinkodierenden Gen eine Vielzahl unterschiedlicher Proteinspezies mit unterschiedlichen Funktionen durch alternatives Spleißen oder posttranslationale Modifizierungen entstehen können. Neil Kelleher schätzte die Zahl der Proteinspezies (von Kelleher „Proteoformen“ genannt) des humanen Proteoms auf ungefähr 1.000.000.000 [6]. Sowohl die Komplexität als auch der dynamische Bereich, der auf ~ 12 Größenordnungen geschätzt wird [7] und die große Vielfalt der physiko-chemischen Eigenschaften der Proteinspezies sind dafür verantwortlich, dass sich die Analyse von Proteomen auf Proteinspezies-Ebene unter Berücksichtigung der exakten chemischen Zusammensetzung intakter Proteinspezies nach wie vor in ihrem Anfangsstadium befindet

[53, 54]. Damit Proteome in Zukunft auf der Ebene intakter Proteinspezies analysiert werden können, ist es zwingend notwendig, neue Methoden und Technologien für die massenspektrometrische Analyse, für die bioinformatischen Auswertung, für die Trennung und für die Extraktion intakter Proteinspezies zu entwickeln.

Ziel dieser Arbeit war es die Hypothese zu prüfen, dass Proteinspezies in intakter Form aus Geweben durch dessen Bestrahlung mit einem Pikosekunden-Infrarotlaser (PIRL) unter Nutzung des Effekts der Desorption durch impulsive Anregung intramolekularer Vibrationszustände (DIVE) freigesetzt werden können. Um Proteome auf der Ebene der Proteinspezies zu analysieren, ist es unerlässlich, dass sich die chemische Zusammensetzung der Proteinspezies durch die PIRL-Ablation nicht verändert. Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, ob sich die chemische Zusammensetzung der Proteinspezies durch den Prozess der PIRL-Ablation ändert. Für diesen Zweck wurde die RNase A als Modelprotein ablatiert und die Ablationsprodukte (RNase A nach PIRL-Ablation) sowie die RNase A vor PIRL-Ablation (Kontrolle) massenspektrometrisch mit der MALDI-MS und der LC-ESI-MS analysiert. Wäre es während der Ablation, dem Phasentransfer oder innerhalb der Ablationswolke zu einer Änderung der chemischen Zusammensetzung durch photomechanische [55, 56], photochemische [57] oder thermische Prozesse [58-60] gekommen, wären neue RNase A-Spezies entstanden. Diese Spezies hätten sowohl in den Spektren als auch in den Chromatogrammen der MALDI-MS- und der LC-ESI-MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation zusätzliche Signale geliefert, die in den Analysen der RNase A vor PIRL-Ablation nicht vorhanden gewesen wären.

Die Spektren der MALDI-TOF-MS-Analyse der intakten RNase A vor und nach PIRL-Ablation waren nahezu identisch (Abbildung 18; Abbildung 47 D, Anhang). In den Spektren konnte kein einziges Signal detektiert werden, welches darauf hindeutete, dass es während des Ablationsprozesses zu einer Änderung der chemischen Zusammensetzung gekommen ist.

Während des Phasentransfers oder innerhalb der Ablationswolke hätte es zu einem Verlust von funktionellen Gruppen in Form von  $\text{H}_2\text{O}$  oder  $\text{NH}_3$  kommen können [61]. Aufgrund der vergleichsweise niedrigen Auflösung des linearen TOF-Massenanalysators und der breiten Signalen der Proteine in den MALDI-Spektren [62, 63] wäre ein Neutralverlust von -18 Da ( $\text{H}_2\text{O}$ ) bzw. -17 Da ( $\text{NH}_3$ ) unter Umständen nicht zu detektieren gewesen. Dies wäre insbesondere

dann der Fall gewesen, wenn die Menge der Proteinspezies, die durch einen Neutralverlust gebildet wurden, in einer deutlichen geringeren Menge vorhanden waren als die intakte Proteinspezies der RNase A. In diesem Fall wären die Spezies neben dem Signal der intakten RNase A schwer zu detektieren gewesen und hätten in den MALDI-Spektren lediglich zu einer leichten Verbreiterung des Signals geführt.

Um sicher zu gehen, dass sich die chemische Zusammensetzung von Proteinspezies ablationsbedingt nicht ändert und dass mit der MALDI-Analyse Veränderungen der Zusammensetzung nicht übersehen wurden, wurden die Ablationsprodukte mit einem System analysiert, welches aus einer Kapillar-Flüssigkeitschromatographie, gekoppelt an ein Elektrospray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometer (LC-ESI-MS/MS) bestand. Die ESI-Analyse lieferte komplementäre Daten zur MALDI-Analyse [64, 65] und die Umkehrphasen-Chromatographie (RP, engl. reversed phase) ermöglichte es, niedrig konzentrierte Moleküle anzureichern und diese von anderen, höher konzentrierten Molekülen abzutrennen. Durch diese Eigenschaften der RP-Chromatographie wurde die Wahrscheinlichkeit erhöht, niedrig abundante RNase A-Spezies, die durch den PIRL-Ablationsprozess entstanden sein könnten, anzureichern, diese zu trennen und massenspektrometrisch nachzuweisen.

Die LC-MS-Analysen der intakten RNase A vor und nach PIRL-Ablation lieferten nahezu identische Chromatogramme und MS-Spektren (Abbildung 19 bis Abbildung 21; Abbildung 47 A und Abbildung 47 B, Anhang). In den Chromatogrammen und den MS-Spektren der RNase A nach PIRL-Ablation wurde kein Signal identifiziert, welches darauf hindeutet, dass es durch den Ablationsprozess zu einer Änderung der chemischen Zusammensetzung der RNase A gekommen ist. Zusammen mit den Ergebnissen der MALDI-MS-Analyse liefern die beschriebenen Ergebnisse keine Hinweise dafür, dass die PIRL-Ablation zu einer signifikanten Änderung der chemischen Zusammensetzung der Proteinspezies führte.

Bestätigt wurden die Beobachtungen der MALDI-MS- und der LC-MS-Analysen der intakten RNase A durch die Ergebnisse der LC-MS/MS-Analysen der RNase A vor und nach PIRL-Ablation auf der Peptidebene. Die Chromatogramme waren bis auf folgende Ausnahmen fast identisch. Im Chromatogramm der RNase A vor PIRL-Ablation wurde ein Signal und im Chromatogramm nach PIRL-Ablation wurden zwei Signale identifiziert, die in dem jeweils anderen Chromatogramm nicht vorhanden waren (Abbildung 2).

Das Chromatogramm der RNase A vor PIRL-Ablation zeigte bei RT 23,02 min ein Signal, welches im Chromatogramm der LC-MS/MS-Analyse nach PIRL-Ablation nicht identifiziert wurde (Abbildung 2, \*1). Das Signal wurde durch ein zweifach geladenes Signal mit einem m/z-Wert von m/z 521,15 [M+2H]<sup>2+</sup> hervorgerufen (Abbildung 3 B). Die manuelle Analyse der LC-MS/MS-Daten der RNase A nach PIRL-Ablation zeigte, dass dieses Signal ebenfalls vorhanden war (Abbildung 3 A). Die Qualität der Fragmentspektren reichte nicht für eine Identifizierung des Signals m/z 521,15 [M+2H]<sup>2+</sup> aus (Abbildung 46, Anhang). Aufgrund des Musters der Fragmentspektren kann allerdings vermutet werden, dass es sich bei dem Vorläuferion um ein Peptid handelte. Die Detektion eines Fragmentions bei m/z 147 deutet darauf hin, dass das Vorläuferion am C-Terminus ein Lysin besaß. Die Fragmentspektren (Abbildung 46, Anhang) und die extrahierten Ionenchromatogramme (Abbildung 5 C und Abbildung 5 D) waren sowohl in der LC-MS/MS-Analyse nach PIRL-Ablation als auch vor PIRL-Ablation weitestgehend identisch. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Unterschied im Chromatogramm der RNase A vor PIRL-Ablation bei RT 23,02 min nicht durch die PIRL-Ablation hervorgerufen wurde. Der beobachtete Unterschied lässt sich auf einen quantitativen Unterschied zurückführen, der aller Wahrscheinlichkeit nach durch die Probenvorbereitung zustande gekommen ist.

Das Signal in dem Chromatogramm der RNase A nach PIRL-Ablation bei RT 23,89 min wurde von zwei unterschiedlich modifizierten Peptiden hervorgerufen (Abbildung 2, \*2). Bei dem einen Peptid handelte es sich um das Peptid mit der Sequenz PyrHMDSSTSAASSSNYCNQMMK. Dieses Peptid besaß am N-Terminus anstelle eines Glutamins ein Pyro-Glutamat (Pyr, Abbildung 7). Bei dem N-terminalen pyro-Glutamat kann es sich einerseits um eine posttranslationale Modifizierung von Proteinen und biologisch aktiven Peptiden handeln, die enzymatisch durch eine Glutamin-Zyklase generiert wird [66, 67]. Zum anderen kann es unter sauren Bedingungen zu einer nicht enzymatischen pyro-Glutamat-Bildung kommen, wenn ein Protein oder ein Peptid am N-Terminus ein Glutamin oder ein Glutamat besitzt. Unter sauren Bedingungen neigen N-terminale Glutamine zu einem Verlust von NH<sub>3</sub>. Anschließend kommt es zu einer Ringbildung, wodurch ein Pyro-Glutamat entsteht [68-70]. Der tryptische Verdau der RNase A vor und nach PIRL-Ablation wurde abgestoppt, indem der pH-Wert mit Ameisensäure auf pH 2,3 eingestellt wurde. Darüber hinaus wurden die tryptischen Peptide für die Entsalzung in 0,1% TFA und für die LC-MS/MS-Analyse in 0,1% FA gelöst. Aller Wahrscheinlichkeit nach kam es unter diesen Bedingungen zur Bildung des N-terminalen pyro-

Glutamats. Da das modifizierte Peptid in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor und nach PIRL-Ablation identifiziert werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass die Modifizierung nicht durch die PIRL-Ablation entstanden ist. Wäre die Modifizierung durch den Ablationsprozess entstanden, hätte es vor der pyro-Glutamatbildung zu einer Abspaltung des Fragments KETAAAKFER ( $m = 1149,61$  Da) kommen müssen, da für die Ringbildung eine freie Aminogruppe vorhanden sein müsste. Die LC-MS- und MALDI-MS-Analysen der intakten RNase A sowie die LC-MS/MS-Analysen der tryptischen Peptide der RNase A nach PIRL-Ablation zeigten allerdings jeweils kein Signal für das KETAAAKFER-Fragment. Darüber hinaus konnte in keiner der Analysen ein Signal für eine RNase A-Spezies detektiert werden, der das KETAAAKFER-Fragment fehlte (Molekülmasse mit einem N-Terminalen Glutamin:  $m = 12549,72$  Da; Molekülmasse mit einem N-Terminalen pyro-Glutamat:  $m = 12532,69$  Da). Die unterschiedliche Menge des modifizierten Peptids in der LC-MS/MS-Analyse vor und nach PIRL-Ablation lässt sich durch einen unterschiedlichen Grad der nicht-enzymatischen Umwandlung von Glutamin zu pyro-Glutamat während der Probenvorbereitung erklären.

Bei dem zweiten Signal handelte es sich um die deamidierte Spezies des Peptids PyrHMDSSTAASSSNYCNQMMK welches statt eines Asparagins ein Aspartat besaß (PyrHMDSSTAASSSNYCDQMMK, Abbildung 8). Krokhin *et al.* [71] und Du *et al.* [72] zeigten in ihren Arbeiten, dass es während der Probenvorbereitung zu einer nicht-enzymatischen Deamidierung von Glutamin- und Asparaginresten kommen kann. Unter den leicht alkalischen Bedingungen des tryptischen Verdau ( $\text{pH } 7,8 - 8,3$ ), zusammen mit der längeren Inkubationszeit bei  $37^\circ\text{C}$  neigen Asparagin- und Glutaminreste zu einer Deamidierung. Hierbei kommt es zunächst zur Bildung eines zyklischen Imids, aus welchem anschließend durch Hydrolyse ein Aspartat bzw. ein Glutamat gebildet wird [73-75]. Die höhere Signalintensität der deamidierten Peptidspezies in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation kann aller Wahrscheinlichkeit nach auf einen höheren Grad der Deamidierung während der Probenvorbereitung im Vergleich zur nicht-ablatierten RNase A zurückgeführt werden. Eine Möglichkeit, dies zu verifizieren, wäre es, den tryptischen Verdau, wie bei Li *et al.* beschrieben, in Gegenwart von  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  durchzuführen [76]. Bei diesem Ansatz kann der Grad der Deamidierung während des tryptischen Verdau bestimmt werden. Allerdings wiesen Capelo *et al.* in einem kritischen Review über die  $^{18}\text{O}$ -Markierung darauf hin, dass die Effizienz der  $^{18}\text{O}$ -Markierung stark von pH-Wert-Variationen sowie den Eigenschaften der Peptide, dem



verwendeten Enzym, der Inkubationszeit und den Pufferbedingungen abhängt, so dass eine vollständige und reproduzierbare Markierung nicht immer gewährleistet werden kann [77].

Das Signal in dem Chromatogramm der RNase A nach PIRL-Ablation bei RT 24,05 min (Abbildung 2) wurde ebenfalls durch ein deamidiertes Peptid (DGQTNCYQSYSTEM(ox.)SITDCR) hervorgerufen. An der Stelle eines Asparagins trug dieses Peptid am N-Terminus einen Aspartatrest. Zusätzlich zu der Deamidierung besaß dieses Peptid statt eines Methionins ein Methioninsulfoxid. Die erhöhte Signalintensität des Peptids in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation wurde vermutlich durch einen höheren Grad der Deamidierung während der Probenvorbereitung verursacht. Unter sauren Bedingungen neigen Asparaginreste zu einer direkten Deamidierung ohne Bildung eines zyklischen Imids als Zwischenprodukt [73, 75, 76]. Die RNase A wurde für die PIRL-Ablation in 0,1% FA (pH 2,3) gelöst und aus dieser Lösung ablatiert. Da die Ablation der Lösung mehrere Minuten dauerte, war die RNase A im Fall der PIRL-Ablation für einen längeren Zeitraum einem sauren pH-Wert ausgesetzt als die nicht-ablatierte RNase A. Dadurch könnte es für die RNase A nach PIRL-Ablation während der Probenvorbereitung zu einem höheren Grad der Asparagin-Deamidierung gekommen sein.

Bei der Methionin-Oxidation kann es sich wie bei der Deamidierung und pyro-Glutamatbildung um eine nicht-enzymatische Proteinmodifizierung handeln, die während der Probenvorbereitung stattfindet [78-83]. Im Gegensatz zu der RNase A-Probe nach PIRL-Ablation konnte in der nicht-ablatierten Probe kein tryptisches RNase A-Peptid identifiziert werden, welches einen oxidierten Methioninrest besaß (Tabelle 1 und Tabelle 2). Bei der manuellen Analyse der MS-Spektren und der Chromatogramme der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation konnten alle Methioninsulfoxid-haltigen Peptide ebenfalls nachgewiesen werden (Abbildung 14). Der Grund dafür, dass die oxidierten Peptide nicht identifiziert wurden, war, dass die Peptide aufgrund einer zu geringen Signalintensität nicht zur Fragmentierung ausgewählt wurden. Die unterschiedlichen Signalintensitäten der Methioninsulfoxid-haltigen Peptide in der LC-MS/MS-Analyse vor und nach PIRL-Ablation lässt sich aller Wahrscheinlichkeit wie im Fall der Deamidierung und der pyro-Glutamatbildung durch einen unterschiedlichen Grad der Modifizierung während der Probenvorbereitung erklären. Wäre es durch die PIRL-Ablation zu einer signifikanten Oxidation der Methioninreste gekommen, hätten die Chromatogramme und Spektren der LC-MS- und MALDI-MS-Analysen

der intakten RNase A nach PIRL-Ablation Signale für die oxidierten RNase A-Spezies zeigen müssen. Allerdings wurden weder in den MALDI-Spektren (Abbildung 18; Abbildung 47, Anhang) noch in den ESI-Spektren und Chromatogrammen der LC-MS-Analysen (Abbildung 20; Abbildung 47, Anhang) Signale detektiert, die darauf hingedeutet hätten, dass es während der PIRL-Ablation zu einer signifikanten Oxidation der Methioninreste gekommen wäre.

In der Proteomanalytik sind nicht-enzymatische Modifizierungen von Proteinen und Peptiden während der Probenvorbereitung, wie die Deamidierung und Methionin-Oxidation, häufig beobachtete Phänomene. Aus diesem Grund werden deamidierte und Methioninsulfoxid-haltige Peptide bei differentiellen Proteomanalysen nicht in die Quantifizierung mit einbezogen [84].

Bei der PIRL-Ablation hätte es unter Umständen zu einer Modifizierung der chemischen Zusammensetzung der RNase A kommen können, die bei einer konventionellen Datenbankanalyse der tryptischen Peptide nicht identifiziert worden wäre. Bei den gängigen Identifizierungsansätzen werden Modifizierungen nur identifiziert, wenn diese bei der Suche berücksichtigt werden. Im Fall der PIRL-Ablation war nicht bekannt, welche Modifizierungen und Änderungen der chemischen Zusammensetzung durch den Ablationsprozesses eventuell hätten entstehen können. Um eventuelle Änderungen der chemischen Zusammensetzung detektieren zu können, wurde in dieser Arbeit ein identifizierungsunabhängiger Vergleich der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor und nach PIRL-Ablation auf der Peptidebene durchgeführt (Abschnitt 7.1.1.3). Hierfür wurde mit dem OpenMS-Programm [85, 86] eine identifizierungsunabhängige Prozessierungskette erstellt. Mit dieser Prozessierungskette und den verwendeten Algorithmen war es möglich, die Signale der LC-MS/MS-Datensätze vor und nach PIRL-Ablation miteinander zu vergleichen, ohne dass diese zuvor mit einem Suchalgorithmus identifiziert werden mussten. Nahezu alle Quantifizierungsalgorithmen, die in der Proteomanalytik verwendet werden, basieren darauf, dass die zu quantifizierenden Signale gleichzeitig auch identifiziert werden müssen [87-92]. Solche Algorithmen und Programme wären für den in dieser Arbeit angestrebten Vergleich nicht geeignet gewesen. Es musste angenommen werden, dass bei Laserenergie-induzierten Reaktionen Produkte unbekannter chemischer Zusammensetzung entstehen können, die mit den oben erwähnten Algorithmen nicht erfasst werden. Bei der identifizierungsunabhängigen bioinformatischen Analyse wurden insgesamt 116 unterschiedliche Signale detektiert. Nach dem Algorithmus

wurden 92 der 116 Signale sowohl im Datensatz der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation als auch im Datensatz der RNase A nach PIRL-Ablation detektiert (Abbildung 15 und Abbildung 16). Der Algorithmus detektierte 6 Signale ausschließlich im Datensatz der RNase A vor PIRL-Ablation und 18 Signale ausschließlich im Datensatz der RNase A nach PIRL-Ablation. Die manuelle Analyse der MS-Spektren ergab, dass keines dieser Signale tatsächlich ausschließlich in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor bzw. nach PIRL-Ablation vorhanden war (Abbildung 17). Bei den 24 Signalen, die laut der bioinformatischen Auswertung entweder nur im Datensatz vor bzw. nach PIRL-Ablation vorhanden wurden, handelte es sich um falsch-negative Identifizierungen des Algorithmus. Einige der Signale konnten von dem Algorithmus nicht im jeweiligen Vergleichsdatsatz detektiert werden, da die Intensität der Signale niedriger war als der verwendete Grenzwert. Für den Großteil der 24 Signale ist der Grund allerdings nicht ersichtlich, warum sie nicht als Features identifiziert werden konnten. Nilse *et al.* publizierten 2010 eine Arbeit, in der Sie die Leistung von zwei Quantifizierungsalgorithmen mit Hilfe eines Testpeptidgemisches miteinander verglichen [93]. Die Ergebnisse zeigen, dass es mit keinem der verwendeten Algorithmen möglich war, alle vorhandenen Peptide zu detektieren und dass es bei jedem Algorithmus zu einer bestimmten Anzahl von falsch-positiven und falsch-negativen Identifizierungen kam, die in Abhängigkeit des verwendeten Massenspektrometers zwischen 12% (LTQ Orbitrap XL) und mehr als 50% (Bruker Esquire 3000plus Ionenfalle) lag. Die Anzahl von falsch-negativen Zuordnungen (20%) der identifizierungsunabhängigen Prozessierungskette in dieser Arbeit stimmt mit den Ergebnissen von Nilse *et al.* gut überein.

Die Ergebnisse des identifizierungsunabhängigen Vergleichs stehen im Einklang mit den Beobachtungen der MALDI-MS- und der LC-ESI-MS-Analysen auf der Protein- und Peptidebene. In keiner Analyse der RNase A vor und nach PIRL-Ablation wurde ein Signal detektiert, welches auf eine signifikante Änderung der chemischen Zusammensetzung hinwies, die durch den PIRL und den Ablationsprozess hervorgerufen wurde. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche RNase A-Lösungen aus zwei unterschiedlichen Chargen mit dem PIRL ablatiert und die chemische Zusammensetzung vor und nach PIRL-Ablation massenspektrometrisch untersucht. In den Analysen der zweiten RNase A-Charge konnte wie bei den Analysen der ersten Charge kein Signal detektiert werden, welches auf eine durch PIRL induzierte Änderung der chemischen Zusammensetzung der RNase A hinwies (Abbildung 47).

Die Ergebnisse der massenspektrometrische Analyse der RNase A vor und nach PIRL-Ablation auf der Protein- und Peptidebene bestätigen die Hypothese, dass Proteine durch die PIRL-Ablation intakt in die Gasphase transportiert werden. Darüber zeigen die Ergebnisse, dass die chemische Zusammensetzung der Proteine durch den Ablationsprozess nicht verändert wird.

Nahezu alle zellulären Prozesse werden durch posttranslationale Modifizierungen reguliert [94-96]. Insbesondere die Proteinphosphorylierung spielt dabei eine entscheidende Rolle [97-100]. Bei der Proteinphosphorylierung handelt es sich um eine reversible posttranslationale Modifizierung, die durch ein System spezifischer Kinasen und Phosphatasen reguliert wird [101]. Im Vergleich zu der Peptidbindung handelt es sich bei der Phosphoesterbindung der Phosphoserine und Phosphothreonine um eine relative schwache chemische Bindung. Durch die Energie des PIRL sowie durch den Phasentransfer und durch Stöße in der Ablationswolke hätte es unter Umständen zu einem Verlust der Proteinphosphorylierung kommen können. Um dies zu untersuchen, wurden neben der RNase A verschiedene Casein-Proteine (Alpha-S1-, Alpha-S2- und Beta-Casein) vor und nach PIRL-Ablation mit der MALDI-MS untersucht (Abschnitt 7.2). Die MALDI-Spektren der intakten Caseine vor und nach Ablation waren nahezu identisch und zeigten Signale für die fünffach phosphorylierte Beta-Casein-Spezies und für die achtfach phosphorylierte Alpha-S1-Casein-Spezies (Abbildung 22). Weder in den Spektren vor noch den Spektren nach PIRL-Ablation wurde ein Signal für die jeweils nicht phosphorylierte Beta- bzw. Alpha-S1-Casein-Spezies. Darüber hinaus zeigte keines der MALDI-Spektren ein Signal für einen Neutralverlust der Phosphatgruppe in Form von  $H_3PO_4$ , wie er beispielsweise bei phosphorylierten Serinen oder Threoninen durch Beta-Eliminierung zustande kommen würde [102]. Die Ergebnisse der MALDI-MS-Analyse der Phosphopeptide, die mit der  $TiO_2$ -Affinitätschromatographie angereicherten wurden, bestätigen die Ergebnisse der MALDI-MS-Analyse der intakten Caseine vor und nach PIRL-Ablation. In dem MALDI-Spektrum der angereicherten Phosphopeptide vor PIRL-Ablation wurde kein einziges Phosphopeptid identifiziert, das nicht auch im MALDI-Spektrum der angereicherten Phosphopeptide nach PIRL-Ablation identifiziert wurde. Die Ergebnisse der MALDI-MS-Analyse der Caseine vor und nach PIRL-Ablation zeigen, dass selbst instabile chemische Modifizierungen wie die Proteinphosphorylierung den PIRL-induzierten Phasentransfer intakt überstehen.

Die Beobachtung, dass es sich bei der PIRL-Ablation um eine sehr schonenden Prozess handelt, konnte mit dem Ergebnis der Western-Blot-Analyse des PIRL-Kondensats der

Lebergewebeablation bestätigt werden (Abschnitt 7.4.2). Der Western-Blot zeigte ein Signal bei knapp über 100 kDa für das Protein CEACAM 1. Die theoretische Molekülmasse des murinen CEACAM 1 ohne Signalpeptid beträgt 53,5 kDa. Bei CEACAM 1 handelt es sich um ein hoch glykosyliertes Protein. Wollscheid *et al.* [103], Tan *et al.* [104] und Ghesquiere *et al.* [105] identifizierten in ihren Arbeiten für CEACAM 1 insgesamt 8 unterschiedliche N-Glykosylierungsstellen und in Uniprot ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org), Stand: 23.September.2015) sind noch 9 weitere N-Glykosylierungsstellen beschrieben, die auf einer Sequenzanalyse basieren. McEntire *et al.* zeigen in ihrer Arbeit unter anderem unter Verwendung der Western-Blot-Analyse, dass die Molekülmasse der glykosylierten CEACAM 1-Spezies 105 kDa beträgt [45]. Die Detektion von CEACAM 1 in dieser Arbeit bei knapp über 100 kDa im Western-Blot stimmte mit der von McEntire *et al.* beschriebenen Molekülmasse für die glykosylierte Spezies gut überein. Da die Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt wurde, kann weitestgehend davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Signal im Western-Blot bei knapp über 100 kDa nicht um ein Dimer der nicht-glykosylierten CEACAM 1-Spezies handelte. Das Ergebnis der Western-Blot-Analyse zeigt, dass das Kondensat der PIRL-Ablation ohne weitere Probenvorbereitung auf eine SDS-PAGE aufgetragen werden konnte und im Anschluss eine Western-Blot-Analyse durchgeführt werden konnte. Darüber hinaus zeigt das Ergebnis der Western-Blot-Analyse, dass das CEACAM 1 zusammen mit den posttranslationalen Glykosylierungen intakt mit PIRL aus dem Lebergewebe freigesetzt werden konnte.

Hüttmann und Birngruber [58, 59] sowie Steel *et al.* [60] zeigen in ihren Arbeiten, dass Proteine durch IR-Laser-Bestrahlung mit Pulslängen im  $\mu$ s-, ns- und ps-Bereich irreversibel denaturiert werden können. Steel *et al.* untersuchten in ihrer Arbeit, welchen Einfluss thermische Prozesse, die durch die IR-Laserablation induziert wurden, auf die Proteinfaltung haben. Durch das kurzzeitige Erhitzen und Abkühlen, das auf einer Zeitskala von wenigen Nanosekunden geschah, wurde sowohl die Katalase als auch die Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase) irreversibel entfaltet. Für die zwei Proteine konnten im Anschluss an die thermische Entfaltung keine enzymatischen Aktivitäten mehr nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der Proteine vor und nach PIRL-Ablation zeigen zwar, dass sich die chemische Zusammensetzung der Proteine durch den Ablationsprozess nicht verändert. Allerdings konnte anhand dieser Experimente nicht geklärt werden, ob es durch thermische Prozesse während des Ablationsprozesses zu einer

Denaturierung der Proteine kommt. Um diese Frage zu beantworten, wurden die Serinprotease Trypsin und humanes Blutplasma mit dem PIRL ablatiert. Die Kondensate wurden anschließend mit Alpha-S1- und Alpha-S2-Casein bzw. mit Angiotensin I (Ang 1-10) inkubiert und massenspektrometrisch analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl Trypsin als auch verschiedene Ang 1-10 metabolisierende Enzyme nach der PIRL-Ablation enzymatisch aktiv waren.

In der LC-MS/MS-Analyse der Casein-Inkubation mit ablatierten Trypsin wurden ausschließlich tryptische Alpha-S1- und Alpha-S2-Casein-Peptide identifiziert und weder in dem Chromatogramm noch in den MS-Spektren wurden Signale für die intakten Alpha-Casein-Proteine identifiziert (Abbildung 24 und Abbildung 25, Tabelle 4 und Tabelle 5).

In dem MALDI-Spektrum des Inkubats der PIRL-ablatierten Plasmaproteine mit Ang 1-10 wurden nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden Signale für Ang 1-8 und Ang 6-10 detektiert (Abbildung 26 C). Die Detektion von Ang 1-8 und Ang 6-10 nach 6 Stunden, deutet darauf hin, dass mindestens zwei unterschiedliche Plasmaproteasen im Anschluss an die PIRL-Ablation enzymatisch aktiv waren [106-108]. Die zusätzliche Identifizierung der Angiotensinpeptide Ang 1-7 und Ang 4-10 nach 24 Stunden Inkubationszeit weisen darauf hin, dass mindestens zwei weitere Angiotensinpeptid-metabolisierende Enzyme [108] nach der PIRL-Ablation enzymatisch aktiv waren. Das MALDI-Spektrum des Kontroll-experiments zeigte nach 24 Stunden Inkubationszeit ein weitestgehend identisches Signalmuster für Ang 1-8, Ang 1-7, Ang 4-10 und Ang 6-10 (Abbildung 26 F), was darauf hindeutet, dass die Enzymaktivität der Ang 1-10 metabolisierenden Proteine nach der PIRL-Ablation weitestgehend erhalten blieb.

Wäre es während der PIRL-Ablation zu einer Denaturierung der Proteasen des Blutplasmas gekommen, hätten die MALDI-Spektren der Inkubate nach 24 Stunden Inkubationszeit nicht nahezu identische Signalmuster für die Ang 1-8, Ang 1-7, Ang 4-10 und Ang 6-10 gezeigt. Die MALDI-Spektren hätten bei einer signifikanten Denaturierung der Proteine während des Ablationsprozesses zumindest geringfügige Unterschiede aufweisen müssen. Auch die Ergebnisse der Inkubation des Caseins mit PIRL-ablatiertem Trypsin deuten darauf hin, dass die Enzymaktivität nach der PIRL-Ablation weitestgehend erhalten blieb, da in der LC-MS/MS-Analyse ausschließlich tryptische Peptide und kein einziges Signal der intakten Casein-Proteine

detektiert wurde. Die Ergebnisse der Inkubationsexperimente in dieser Arbeit zeigen, dass es durch die PIRL-Ablation von Proteinen aus wässrigen Lösungen zu keiner signifikanten Denaturierung der Proteine kommt, und bestätigen den sanften Prozess der PIRL-Ablation.

Neben der Hypothese, dass Proteine mit dem PIRL intakt in die Gasphase transportiert werden, wurde in dieser Arbeit der Hypothese gefolgt, dass es sich bei der PIRL-Ablation um eine schonende und ultraschnelle Methode handelt, um Proteine aus Gewebeproben freizusetzen. Um dies zu überprüfen, wurden verschiedene Gewebeproben mit dem PIRL ablatiert und die Kondensate mit verschiedenen Methoden der Protein- und der Proteomanalytik analysiert.

Zunächst wurde untersucht, ob sich in den Kondensaten der PIRL-Ablation von Gewebeproben Proteine nachweisen lassen. Zu diesem Zweck wurde ein Mausmuskel für 5 Minuten mit dem PIRL bestrahlt. Insgesamt wurde eine Fläche 5 mm x 5 mm und einer Tiefe von 1,5 mm ( $V = 37,5 \text{ mm}^3$ ) verdampft. Die Proteinbestimmung des Kondensats ergab, dass mit der PIRL-Ablation eine Gesamtproteinmenge von 965  $\mu\text{g}$  gewonnen werden konnte (Abbildung 48, Anhang). Zum Vergleich hierzu betrug die Gesamtausbeute der konventionellen Proteinextraktion eines vergleichbaren Volumens des Mausmuskelgewebes 175  $\mu\text{g}$  (Abbildung 48, Anhang). Die höhere Proteinausbeute im Fall der PIRL-Ablation kann eventuell darauf zurückgeführt werden, dass die Proteine bei der PIRL-Ablation in einem einzigen experimentellen Schritt aus dem Gewebe freigesetzt und in ein Aerosol überführt wurden. Durch das Ausfrieren des PIRL-Aerosols wurde ein flüssiges Homogenat gewonnen, das weitestgehend frei war von Partikeln. Bei der konventionellen Proteinextraktion mussten die Proteine des homogenisierten Gewebes durch Inkubation mit einem Lysepuffer in Lösung gebracht werden. Im Vergleich zu dem Homogenat der PIRL-Ablation enthielt das konventionelle Homogenat unlösliche Partikel. Diese nicht löslichen Partikel könnten Proteine enthalten haben, die durch Zentrifugation abgetrennt wurden und dadurch verloren gingen. Darüber hinaus könnte es bei der klassischen Proteinextraktion zu einem weiteren Probenverlust durch die Adsorption von Proteinen an den Oberflächen der Partikeln gekommen sein. Feist und Hummon weisen in Ihrem kürzlich publizierten Review darauf hin, dass es während der Proteinextraktion zu signifikanten Verlusten durch Adsorption von Proteinen an Oberflächen kommen kann [109]. Ein weiterer Grund für die die höhere Proteinausbeute bei der PIRL-Ablation könnte die Reduzierung der experimentell

notwendigen Schritte darstellen. Wie bereits weiter oben erwähnt, wurden die Proteine bei der PIRL-Ablation in einem einzigen experimentellen Schritt aus dem Gewebe freigesetzt und in ein Aerosol überführt. Im Vergleich zur PIRL-Ablation waren bei der konventionellen Proteinextraktion mehrere Probenvorbereitungsschritte notwendig, bei denen es jeweils zu einem Verlust des Probenmaterials gekommen sein könnte. Wiśniewski publizierte im Jahr 2013 eine Arbeit, in der er eine Methode für die Proteinextraktion aus Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem Gewebe beschreibt [110]. In dieser Arbeit zeigt Wiśniewski, dass es aufgrund unterschiedlichen Aufarbeitungsschritten zu Proteinverlusten von 40-70% kommen kann.

Darüber wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die mit PIRL gewonnenen Kondensate direkt und ohne weitere Probenvorbereitung mit der SDS-PAGE analysiert werden konnten (Abbildung 28 B) und dass sich Proteine aus den PIRL-DIVE-Kondensaten mittels Western-Blot-Analyse nachweisen ließen (Abbildung 29 B). Die Gelelektrophorese des Mausmuskelkondensats zeigte, dass mit dem PIRL eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine aus dem Muskelgewebe freigesetzt werden konnten. Die Banden auf dem SDS-PAGE Gel erstreckten sich über den gesamten Molekulargewichtsbereich der Gelelektrophorese von kleiner 10 kDa bis weit über 250 kDa (Abbildung 28 B). Knapp unterhalb der 250 kDa-Markerbande wurden verschiedene Myosin-Proteine identifiziert. Die theoretische Molekülmasse der Myosine von  $\sim 222$  kDa stimmte mit der Position der Bande knapp unterhalb der 250 kDa-Markerbande gut überein. Bei dem Protein Myosin-4 ( $m = 222720$  Da) handelte es sich um die Hauptkomponente der Bande. Für das Myosin-4 wurden insgesamt 66 verschiedene Peptide identifiziert, womit eine Sequenzabdeckung von 35% erreicht werden konnte. Sowohl die hohe Anzahl der identifizierten Peptide als auch die Verteilung der Peptide innerhalb der Proteinsequenz deuten darauf hin, dass das Myosin-4 intakt und in großer Menge mit dem PIRL aus dem Gewebe freigesetzt werden konnte. Direkt unterhalb der Ladungstasche des Gels wurde das knapp 4 MDa große Protein Titin ( $m = 3816030$  Da) identifiziert. Die LC-MS/MS-Analyse resultierte in einer Identifizierung von insgesamt 86 unterschiedlichen Peptiden von Titin, die einen Sequenzbereich von insgesamt 32212 Aminosäuren abdecken, was einer Molekülmasse von  $m = 3,57$  MDa entspricht. Aufgrund dieser Ergebnisse und der Position des Titins im Gel direkt unterhalb der Ladungstasche kann angenommen werden, dass dieses MDa-Protein wie die Myosin-Proteine intakt und in großer Menge aus dem Muskelgewebe freigesetzt werden konnte.



Durch diese Ergebnisse konnte die Hypothese bestätigt werden, dass es sich bei der PIRL-Ablation um eine schonende und äußerst schnelle Methode handelt, um Proteine aus Gewebeproben freizusetzen. Die Ergebnisse zeigen, dass es mit dem PIRL möglich ist, innerhalb von wenigen Sekunden bzw. Minuten und in einem einzigen experimentellen Schritt proteinhaltige Kondensate zu gewinnen. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass die gewonnenen Kondensate mit verschiedenen Methoden der Protein- bzw. der Proteomanalytik direkt analysiert werden können. Zusammen mit der Beobachtung, dass die PIRL-Ablation die Proteine intakt in die Gasphase transportierte und dass selbst instabile posttranslationale Modifizierungen den Ablationsprozess intakt überstanden, wurde eine weitere Hypothese aufgestellt. Es wurde angenommen, dass die PIRL-Ablation einen besseren Blick auf die ursprüngliche Proteinspezies-Zusammensetzung von Gewebeproteomen *in-vivo* ermöglicht.

Während der Homogenisierung werden die intakten zellulären Strukturen der Gewebeproben aufgebrochen. Hierdurch werden Enzyme aus ihren intrazellulären Kompartimenten freigesetzt, wodurch es zu einem proteolytischen und enzymatischen Abbau von Proteinen bzw. von posttranslationalen Modifizierungen kommen kann. Ahmed und Gardiner beobachteten in ihrer Arbeit, dass es während der Probenaufarbeitung bereits nach wenigen Minuten durch enzymatisch aktive Phosphatasen bzw. Proteasen zu einem Verlust von Phosphorylierungen bzw. zu einer Zunahme von Proteolyseprodukten kommen kann [32]. Ähnliche Beobachtungen wurden von Stingl *et al.* gemacht, als sie in ihrer Arbeit den Grad der proteolytischen Prozessierung von Proteinen und Peptiden während der Aufarbeitung von Gewebeproben untersuchten [33]. Stingl *et al.* zeigten, dass selbst bei der Verwendung von 8M Harnstoff 12,5% der identifizierten Peptide in der Peptidomanalyse während der Probenaufarbeitung generiert wurden. Sowohl Ahmed und Gardiner [32] als auch Stingl *et al.* [33] weisen in ihren Arbeiten darauf hin, dass Proteom- und Peptidomanalysen von Gewebeproben aufgrund von aufarbeitungsbedingten Modifizierungen eine Mischung der *in-vivo* und *in-vitro* Zusammensetzung des Proteoms bzw. Peptidoms zeigen können. Durch die weiter oben beschriebenen Eigenschaften des PIRL und der Kondensate, die durch die PIRL-Ablation gewonnen werden, sollte es möglich sein, aufarbeitungsbedingte Modifizierungen durch enzymatische Reaktionen zu reduzieren. Um diese Annahme zu prüfen, wurden von drei humanen Tonsillen durch PIRL-Ablation (PIRL-DIVE-Homogenat) und mit einem Kryomörser (konventionelles, mechanisches Homogenat) Homogenate gewonnen. Die Homogenate

wurden unter weitgehend identischen Bedingungen aufgearbeitet und mit Methoden der differentiellen Proteomanalytik analysiert.

Die Ergebnisse der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2DE) zeigen, dass im Homogenat der PIRL-Ablation eine höhere Anzahl intakter und unterschiedlicher Proteinspezies für einzelne Gene identifiziert werden konnte (Abbildung 31, Tabelle 6). Bei der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase und der Phosphoglyceratkinase 1 handelt es sich um zwei Proteine, für die in der Literatur mehrere O-Phosphorylierungen [111-117] und Lysinacetylierungen [118] beschrieben sind. Durch diese Modifizierungen entstehen unterschiedliche Spezies, die sich in ihren physiko-chemischen Eigenschaften unterscheiden und in der 2DE bei unterschiedlichen isoelektrischen Punkten detektiert werden. Während im konventionellen Homogenat für das Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Gen eine einzige Proteinspezies identifiziert wurde, konnten im PIRL-DIVE-Homogenat insgesamt 11 verschiedene Proteinspezies des Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Gens identifiziert werden. Darüber hinaus konnten im 2DE-Gel des Homogenats der PIRL-Ablation vier unterschiedliche Proteinspezies des Phosphoglyceratkinase 1-Gens identifiziert, wohingegen im 2DE-Gel des konventionellen Homogenats keine einzige Proteinspezies des Phosphoglyceratkinase 1-Gens identifiziert wurde. Die höhere Anzahl von Proteinspezies im 2DE-Gel des PIRL-DIVE-Homogenats könnte darauf zurückgeführt werden, dass es im Vergleich zur konventionellen Aufarbeitung während der PIRL-Ablation zu einem geringeren Abbau intakter Proteinspezies durch enzymatische Reaktionen kam. Dieses Ergebnis würde mit den Beobachtungen von Ahmed und Gardiner, dass es während der Aufarbeitung von Gewebeproben zu einem Verlust phosphorylierter Proteinspezies aufgrund von enzymatischen Abbaureaktionen durch Phosphatasen kommt, übereinstimmen [32]. Auf dem 2DE-Gel des konventionellen Homogenats wurde im Vergleich zum 2DE-Gel des PIRL-DIVE-Homogenats eine höhere Anzahl von Spots mit Molekülmassen kleiner 20 kDa beobachtet (Abbildung 31). Im 2DE-Gel des konventionellen Homogenats wurden für die Gene Hämoglobin Untereinheit Alpha (HBA) und Hämoglobin Untereinheit Beta (HBB) Proteinspezies identifiziert, deren Molekülmassen mit etwas mehr als 6 kDa kleiner waren als die der jeweiligen intakten Proteinspezies nach Synthese des HBA- ( $m = 15,2$  kDa) bzw. des HBB-Gens ( $m = 16$  kDa) (Vollängen-Proteinspezies, Tabelle 6). Darüber hinaus wurden Proteinspezies verschiedener Myosin-Gene mit Molekülmassen von knapp 15 kDa identifiziert (Tabelle 6). In dem 2DE-Gel des PIRL-DIVE-Homogenat konnten weder Proteinspezies des

HBA- oder des HBB-Gens mit Molekülmassen kleiner 10 kDa noch Proteinspezies verschiedener Myosin-Gene mit Molekülmassen kleiner 20 kDa identifiziert werden (Tabelle 6). Anhand dieser Ergebnisse wurde die Annahme aufgestellt, dass intakte Proteinspezies während der konventionellen Probenaufarbeitung in einem größeren Ausmaß proteolytischen Abbaureaktionen ausgesetzt waren als bei der PIRL-Ablation.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurden die Homogenate der drei biologischen Replikate mit der eindimensionalen Gelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt. Die Banden der Gelelektrophoresen wurden tryptisch verdaut und die tryptischen Peptide wurden massenspektrometrisch analysiert. Anhand von extrahierten Ionenchromatogramme wurden für die identifizierten Proteine Migrationsprofile (Peakfläche definierter Peptidionen versus Position auf der Gelelektrophorese bezogen auf das Molekulargewicht) erstellt, mit denen der proteolytische Abbau intakter Proteinspezies während der konventionellen Homogenisierung und während der PIRL-DIVE-Homogenisierung verglichen werden konnte.

Der durchschnittliche relative Proteolyse-Grad betrug in den konventionellen Homogenaten der drei Tonsillen 22,41% (+/- 9,01%, Abbildung 39 D; Tabelle 12 und Tabelle 13, Anhang). Wie bei Stingl *et al.* [33] wurde auch in dieser Arbeit trotz der Verwendung chaotroper Verbindungen (Harnstoff und Thioharnstoff) im Fall der konventionellen Aufarbeitung von Gewebeproben eine hohe Anzahl von Proteolyseprodukten beobachtet. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass der relativen Grad der Proteolyse zwischen den einzelnen biologischen Replikaten bei der konventionellen Homogenisierung stark variierte (Grad der relativen Proteolyse: Tonsille Nr.1: 30,18%, Tonsille Nr. 2: 12,53%, Tonsille Nr. 3: 24,53%; Tabelle 13, Anhang). Im konventionellen, mechanischen Homogenat der humanen Tonsille Nr. 2 wurden zum Beispiel nahezu ausschließlich intakte Proteinspezies des Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase-Gens identifiziert (Abbildung 59, Anhang), wohingegen in den Homogenaten der humanen Tonsille Nr. 1 und Nr. 3 hauptsächlich Proteinspezies mit einer Molekülmasse von kleiner 28 kDa sowie weitere Spezies mit Molekülmassen bis zu kleiner 6 kDa identifiziert wurden. Im Vergleich hierzu wurden in den drei Homogenaten der PIRL-Ablation nahezu ausschließlich intakte Proteinspezies des Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase-Gens identifiziert (Abbildung 35 und Abbildung 59, Anhang). In den Homogenaten der PIRL-Ablation lag der durchschnittliche relative Proteolyse-Grad bei 1,92% (+/- 1,22%, Abbildung 39 D; Tabelle 12 und Tabelle 13, Anhang). Im Vergleich zur

konventionellen Probenaufarbeitung war die PIRL-DIVE-Homogenisierung reproduzierbar mit einem signifikant niedrigeren Proteolyse-Grad assoziiert (Grad der relativen Proteolyse: Tonsille Nr. 1: 0,75%, Tonsille Nr. 2: 3,19%, Tonsille Nr. 3: 1,82%; Tabelle 13, Anhang).

Besonders deutlich zeigt sich der unterschiedliche Grad der Proteolyse zwischen der konventionellen Homogenisierung und der PIRL-DIVE-Homogenisierung in den Migrationsprofilen der Proteinspezies des Kollagen-Gens COL6A3 und den Migrationsprofilen der Proteinspezies des Gens Ku70 der humanen Tonsille Nr. 1 (Abbildung 34). Von dem COL6A3-Gen wurden im PIRL-DIVE-Homogenat hauptsächlich Proteinspezies mit einer Molekülmasse größer 200 kDa identifiziert, wobei der Großteil der Spezies knapp unterhalb der Ladungstasche des Gels detektiert wurde (Abbildung 49 Bande 02, Anhang). Obwohl die theoretische Molekülmasse des COL6A3-Gens nach Proteinsynthese 341 kDa betragen sollte, konnten bisher weder in der Zellkultur noch in Gewebeproben COL6A3-Spezies mit der entsprechenden Molekülmasse nachgewiesen werden [119]. In der Literatur sind für das COL6A3-Gen Proteinspezies mit Molekülmassen zwischen 200 kDa und 290 kDa beschrieben [120-124], welche unter anderem durch alternatives Spleißen aus dem COL6A3-Gen entstehen [125-127]. Die Molekülmassen der COL6A3-Spezies, die im PIRL-DIVE-Homogenat identifiziert wurden, stimmen weitestgehend mit den in der Literatur beschriebenen Molekülmassen überein. Die COL6A3-Spezies mit einer Molekülmasse kleiner 200 kDa könnten kurz nach der Tonsillektomie entstanden sein, da Kollagen-Proteine sehr schnell durch verschiedene Proteasen und Kollagenasen abgebaut werden [128]. Im Gegensatz zu dem Migrationsprofil des PIRL-DIVE-Homogenats zeigte das Migrationsprofil des konventionellen Homogenats nahezu ausschließlich COL6A3-Spezies mit Molekülmassen zwischen 198 kDa und kleiner 3 kDa (Abbildung 34). Eine ähnliche Beobachtung wurde für die Proteinspezies des DNA-Reparaturproteins Ku70 gemacht. Während im Homogenat der PIRL-Ablation ausschließlich Vollängen-Proteinspezies für Ku70 identifiziert wurden, konnte im konventionellen Homogenat keine einzige Vollängen-Spezies des Ku70-Gens identifiziert werden. Stattdessen wurden im konventionellen Homogenat ausschließlich Proteinspezies identifiziert, deren Molekülmassen sich von 28 kDa bis zu kleiner 3 kDa erstreckten. Die Ergebnisse zeigen, dass es während der konventionellen Homogenisierung zu einem nahezu vollständigen proteolytischen Abbau der Vollängen-Proteinspezies des COL6A3- und Ku70-Gens gekommen ist, wohingegen im Homogenat der PIRL-Ablation weitestgehend intakte Proteinspezies identifiziert wurden.

Die signifikant geringere Menge von enzymatischen Abbauprodukten bei der PIRL-DIVE Homogenisierung kann aller Wahrscheinlichkeit nach auf den Prozess zurückgeführt werden, mit dem das proteinhaltige PIRL-DIVE-Kondensat gewonnen wird. Bei der PIRL-Ablation wird das Gewebe innerhalb von wenigen Millisekunden verdampft, wodurch ein proteinhaltiges Aerosol entsteht. Das proteinhaltige Aerosol wird extrem schnell in eine Kühlfalle transportiert, die von flüssigem Stickstoff umgeben ist. In der Kühlfalle wird das proteinhaltige Aerosol ausgefroren (PIRL-DIVE-Kondensat) und enzymatische Abbaureaktionen nahezu vollständig gestoppt. Da dieser Prozess in wenigen Millisekunden bzw. Sekunden stattfindet, sind die intakten Proteinspezies bei der PIRL-DIVE-Homogenisierung enzymatischen Abbaureaktionen nur innerhalb eines extrem kurzen Zeitfensters ausgesetzt. Dies würde erklären, warum bei der PIRL-DIVE-Homogenisierung die Ausbeute enzymatischer Abbauprodukte signifikant niedriger war als bei der konventionellen Homogenisierung.

Neben der geringeren Anzahl enzymatischer Abbauprodukte war die PIRL-Ablation verglichen mit der konventionellen Homogenisierung mit einer höheren Proteinidentifizierungsrate assoziiert (Abbildung 39 A). Die Zahl der Proteine, die reproduzierbar in all den drei biologischen Replikaten identifiziert werden konnten, war bei der PIRL-DIVE-Homogenisierung (1343 Proteine, Abbildung 39 B) deutlich höher als bei der konventionellen Homogenisierung (974, Abbildung 39 B). Auch die Anzahl der Proteine, die in den drei biologischen Replikaten ausschließlich im Homogenat der PIRL-Ablation identifiziert wurde (504 Proteine, Abbildung 39 C), war deutlich höher als im Homogenat der konventionellen Homogenisierung (134 Proteine, Abbildung 39 C). Die höhere Anzahl der identifizierten Proteine kann, wie bereits weiter oben beschrieben, darauf zurückgeführt werden, dass das PIRL-DIVE-Kondensat im Vergleich zum konventionellen Homogenat weitestgehend frei von Partikeln war und es dementsprechend bei der Probenaufarbeitung zu einem geringeren Probenverlust kam.

Die Ergebnisse der differentiellen Proteomanalyse bestätigen die Hypothese, dass die PIRL-Ablation im Vergleich zur konventionellen Homogenisierung einen besseren Blick auf die Proteinspezies-Zusammensetzung von Gewebeproben *in-vivo* ermöglicht.

Mit der kalten Verdampfung von Geweben durch den PIRL könnten in Zukunft Momentaufnahmen der *in-vivo* Proteinspezies-Zusammensetzung von Gewebeproben

aufgenommen werden. Dies könnte neue Informationen über zellphysiologische Zusammenhänge und Pathomechanismen auf der Proteinspezies-Ebene liefern, die mit den aktuell vorhandenen Methoden der Aufarbeitung von Gewebeproben nicht zugänglich sind. Darüber hinaus könnten mit Hilfe der PIRL-Ablation neue krankheitsassoziierte Proteinspezies identifiziert und validiert werden. Trotz der großen Anzahl von potentiellen Proteinmarker-Kandidaten, die in den letzten 20 Jahren mit Hilfe der Proteomanalytik in der Literatur beschrieben wurden, wurde nur ein Bruchteil dieser Marker-Kandidaten von der FDA (US Food and Drug Administration) als tatsächliche Biomarker zugelassen [129, 130]. In dem Review von Anderson wird hervorgehoben, dass die Proteinbiomarker, die bislang von der FDA zugelassenen wurden, alle auf Arbeiten vor dem Beginn der Proteomanalytik im Jahre 1995 zurückgehen [129]. Eine der Ursachen für diese Diskrepanz liegt laut Yi *et al.* darin, dass sich potentielle Marker-Kandidaten experimentell nicht validieren lassen [30]. Eine mögliche Ursache hierfür könnte darin liegen, dass es während der Probenaufarbeitung zu einem enzymatischen Abbau der Marker-Kandidaten kommt. Die Onkogenaktivität der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die mit einer Reihe von Tumorerkrankungen assoziiert ist [131-134], liegt in der Aktivierung der Proteinkinase B (Protein: Proteinkinase B, AKT, Gen: AKT1) [135, 136]. Hierbei kommt es zur Bildung von Proteinspezies des AKT1-Gens, die an der Aminosäureposition 473 ein phosphoryliertes Serin (pSer-473) besitzen (pSer-473-AKT-Spezies). Der Antikörper basierte Nachweis von pSer-473-AKT-Spezies wird verwendet, um die PI3K-Aktivität in Gewebeproben zu bestimmen [137]. Der Nachweis phosphorylierter AKT-Spezies im Tumorgewebe von Prostatakrebs-Patienten eignet sich laut Culig [138] und Kreisberg *et al.* [139] für die Diagnose einer frühzeitigen Tumordifferenzierung, die mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Allerdings publizierten Baker *et al.* eine Arbeit, in der Sie zeigen, dass es während der Probenaufarbeitung durch enzymatische Reaktionen in kurzer Zeit zu einem Abbau der pSer-473-AKT-Spezies kommt [134]. Die von Baker *et al.* bestimmte Halbwertszeit der phosphorylierter AKT-Proteinspezies betrug bei Raumtemperatur ungefähr 20 Minuten [134]. Ein enzymatischer Abbau phosphorylierter AKT-Spezies während der Probenaufarbeitung würde dazu führen, dass die Ergebnisse nicht mehr den *in-vivo* Zustand, sondern eine Mischung des *in-vivo* und des *in-vitro* Zustands darstellen. Dies könnte unter Umständen dazu führen, dass sich ein potentieller Marker-Kandidat wie die pSer-473-AKT-Spezies nicht validieren lässt. Solche aufarbeitungsbedingte Modifizierungen krankheitsassoziiertes Proteinspezies könnten mit der PIRL-Ablation zukünftig vermieden

werden. Die krankheitsassoziierten Proteinspezies könnten mit dem PIRL innerhalb von wenigen Millisekunden aus dem Gewebe freigesetzt und innerhalb kürzester Zeit in einem Kondensat ausgefroren werden, wodurch sie enzymatischen Abbaureaktion nur für einen äußerst kurzem Zeitraum ausgesetzt wären. Die Proteinspezies in dem Kondensat könnten ohne weitere Probenvorbereitung direkt auf SDS-PAGE aufgetragen und per Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Alternativ könnten die Marker Kandidaten in den Kondensaten ohne weitere Probenvorbereitung tryptisch verdaut und massenspektrometrisch zum Beispiel mittels SRM (engl. single reaction monitoring) identifiziert und quantifiziert werden [140].

## 9 Materialien und Methoden

### 9.1 PIRL-DIVE Ablation

Bei dem ps-IR-Laser (PIRL) handelte es sich um einen Nd:YAG-Laser. Es wurde zunächst ein Primärlaser mit einer Wellenlänge von 1  $\mu\text{m}$  erzeugt. Durch die Verwendung eines OPA (optischer parametrischer Verstärker, PIRL-HP2-1064 OPA-3000 Attodyne Inc., Toronto, Kanada) wurde eine Wellenlänge von 3  $\mu\text{m}$  erzeugt. Der PIRL operierte mit einer Wiederholungsrate von 1 kHz und Laserpulslängen von 300 ps. Mit Hilfe von optischen Spiegeln wurde der Laserstrahl zur Probenoberfläche geleitet und auf dieser fokussiert. Die optische Laserleistung auf der Probenoberfläche betrug ungefähr 450 mW. Die optische Energiedichte auf der Probenoberfläche betrug 3,39 J/cm<sup>2</sup> und die mittlere optische Leistungsdichte betrug 3,39 x 10<sup>3</sup> W/cm<sup>2</sup>. Während der Ablationsexperimente betrug die Scangeschwindigkeit des PIRL 130 mm/s. Die PIRL-Ablation von Lösungen wurde mit einem quadratischen Scanmuster von 4 mm x 4 mm durchgeführt, wohingegen die Gewebeproben mit einem quadratischen Scanmuster von 5 mm x 5 mm ablatiert wurden. Der PIRL wurde für die Ablationsexperimente von einer Mitarbeiterin bzw. einem Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dwayne Miller (Max-Planck-Institut für Struktur und Dynamik der Materie, Hamburg) hochgefahren und einsatzbereit gemacht sowie während der Ablationsexperimente überwacht.

### 9.2 Experimente zur Analyse der chemischen Zusammensetzung von PIRL-ablatierten Proteinen

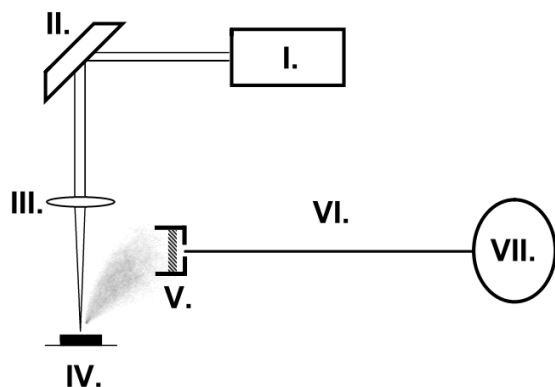
#### 9.2.1 Analyse der chemischen Zusammensetzung PIRL-ablatierter RNase A Moleküle

Um zu untersuchen, ob sich die chemische Zusammensetzung der Proteine durch den PIRL-DIVE-Prozess verändert, wurde als Modelprotein die RNase A (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) verwendet. Zwei unterschiedliche RNase A-Chargen wurden ablatiert und massenspektrometrisch untersucht.



### 9.2.1.1 PIRL-Ablation von RNase A Molekülen

Für die Ablationsexperiment wurde jeweils eine RNase A Stammlösung hergestellt ( $c = 5,9 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , gelöst in 0,1% Ameisensäure (FA), 99,9% HPLC- $\text{H}_2\text{O}$ ). Die ablatierten RNase A Moleküle wurden durch eine selbst konstruierte Auffangvorrichtung eingefangen (Abbildung 40). Die Konstruktion bestand aus einer Membranpumpe (MZ 2C VARIO, VACUUBRAND GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland, Abbildung 40 VII), an der ein Teflonschlauch (Abbildung 40 VI) angebracht wurde, an dessen Ende sich ein Plastikgehäuse befand. In das Plastikgehäuse wurde eine ausgestanzte Membran positioniert, die aus C8-Umkehrphasenmaterial (RP, reversed phase) bestand (Abbildung 40 V). Vor der Ablation wurde die C8-RP-Membran drei Mal mit jeweils  $300 \mu\text{L}$  100% Acetonitril (ACN) konditioniert und anschließend drei Mal mit  $300 \mu\text{L}$  0,1% FA (gelöst in HPLC- $\text{H}_2\text{O}$ ) äquilibriert. Für die Ablation wurden  $300 \mu\text{L}$  der RNase A-Lösung ( $c = 5,9 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) in das Probengefäß überführt und mit Hilfe des PIRL ablatiert (Abschnitt 9.1). Durch die Membranpumpe wurden die Ablationsprodukte über die C8-RP-Membran gesogen. Als Vergleichsprobe (Kontrolle) wurden  $300 \mu\text{L}$  der RNase A-Lösung ( $c = 5,9 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) auf eine, wie oben beschrieben, vorab konditionierte und äquilibrierte C8-RP-Membran transferiert. Die Lösung wurde mit Hilfe der Membranpumpe über die C8-RP-Membran gesogen.



**Abbildung 40: Schematische Darstellung der selbst konstruierten Membranvorrichtung, die verwendet wurde, um die Produkte der PIRL-DIVE-Ablation aufzufangen.** I. PIRL II. optischer Spiegel III. optische Linse zur Fokussierung des PIRL IV. Probenhalterung V. Plastikgehäuse, in welches eine ausgestanzte C8-RP-Membran (gestrichelte Fläche) positioniert wurde VI. Teflonschlauch VII. Membranpumpe. Abbildung nach Kwiatkowski *et al.* [41].

### **9.2.1.2 Elution der RNase A vor und nach PIRL-Ablation von der C8-RP-Membran**

Die C8-RP-Membran der ablatierten und der nicht-ablatierten RNase A wurde jeweils in eine P200-Pipettenspitze (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. Das obere Ende der P200-Pipettenspitze wurde abgeschnitten und eine weitere P200-Pipettenspitze wurde am unteren Ende so zugeschnitten, dass sie mit dem oberen Ende der P200-Pipettenspitze, welche die C8-RP-Membran enthielt abschloss. Das obere Ende der zweiten P200-Pipettenspitze wurde dazu noch so zugeschnitten, dass einer 1 mL Spritze darauf platziert werden konnte. Die C8-RP-Membran wurde mit 200  $\mu\text{L}$  0,1% FA (gelöst in HPLC- $\text{H}_2\text{O}$ ) gewaschen und die gebundenen Analyten anschließend mit jeweils 200  $\mu\text{L}$  0,1% FA, 70% ACN (gelöst in HPLC- $\text{H}_2\text{O}$ ) eluiert. Die Eluate wurden zur Trockne eingedampft und anschließend in jeweils 20  $\mu\text{L}$  0,1% FA (gelöst in HPLC- $\text{H}_2\text{O}$ ) gelöst.

### **9.2.1.3 Analyse der chemischen Zusammensetzung der RNase A vor und nach PIRL-Ablation auf der Peptidebene**

Um die chemische Zusammensetzung der ablatierten und nicht-ablatierten RNase A Moleküle auf der Peptidebene miteinander vergleichen zu können, wurden von den Proben jeweils 5  $\mu\text{L}$  in 295  $\mu\text{L}$  HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und tryptisch verdaut. Anschließend wurden die tryptischen Peptide entsalzt und massenspektrometrisch analysiert.

#### **9.2.1.3.1 Tryptischer Verdau in Lösung**

Der tryptische Verdau in Lösung erfolgte nach Wisniewski et al. [141] in einem Zentrifugenfilter mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland). Die Proben wurden in einen Zentrifugenfilter überführt und für 20 min bei 14680 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde den Retentaten jeweils 500  $\mu\text{L}$  6 M Harnstoff zugegeben und die Proben wurden erneut für 20 min bei 14680 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zwei Mal wiederholt. Zur Reduzierung der Disulfidbrücken wurden den Retentaten jeweils 1,3  $\mu\text{L}$  100 mM DTT (gelöst in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) hinzugegeben und die Proben wurden für 10 min bei 56°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Sulfhydrylgruppen der Cysteine irreversibel alkyliert. Dies geschah durch die Zugabe von jeweils 1,3  $\mu\text{L}$  300 mM IAA (gelöst in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) und einer Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln für 30 min. Nach der Alkylierung wurden den Retentaten 425  $\mu\text{L}$  100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (gelöst in HPLC-

H<sub>2</sub>O) hinzugegeben. Für den tryptischen Verdau wurde den Retentaten 1 µL Trypsin-Lösung (c= 0,25 µg/µL Trypsin sequencing-grade, Promega, Mannheim, Deutschland, gelöst in Trypsin-Resuspensionspuffer) hinzugegeben. Der tryptische Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C. Nach dem tryptischen Verdau wurden die Probe für 20 min bei 14680 rpm zentrifugiert und die Filtrate in einem 2 mL Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Filtrate wurden durch die Zugabe von 0,9 µL 100%iger FA angesäuert und zur Trockne eingedampft. Im Anschluss wurde die Proben in 70 µL 0,1% TFA (gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) gelöst und, wie in Abschnitt 9.2.1.3.2 beschrieben, entsalzt.

#### **9.2.1.3.2 Entsatzung mit der RP-Chromatographie**

Die Entsatzung der tryptischen Peptide erfolgte mit selbstgebauten Mikrosäulen, welche mit einem Reversed-Phase-Chromatographiematerial auf Polymerbasis (OligoR3™, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) gefüllt wurden. Für die Mikrosäule musste zunächst ein Adapter angefertigt werden. Dazu wurden das obere und das untere Ende einer 200-µL-Pipettenspitze (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) so zugeschnitten, dass das untere Ende mit einer 10 µL-Pipettenspitze (GELoader, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) abschloss. Auf das obere Ende des Adapters wurde eine 1 mL Spritze platziert. Anschließend wurde mit einer 10µL-Pipettenspitze (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) eine Fritte aus einer C18-RP-Extraktionsmembran (3M Empore™ Disks, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) ausgestanzt. Die Fritte wurde mit einer Fused-Silica-Kapillare (Außendurchmesse: 360 µm) in das sich verjüngende Ende eines GELoaders (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) platziert. Die Fritte wurde mit 20 µL 100% ACN gewaschen. Die Packung der Mikrosäule erfolgte mit 10 µL der Lösung des RP-Chromatographiematerials (c = 4 mg/mL, Oligo™R3-Bulk-Medium, gelöst in 50% ACN, 50% HPLC-H<sub>2</sub>O). Die Mikrosäule wurde mit 60 µL 70% ACN, 0,1% TFA (gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) konditioniert und anschließend mit 60 µL 0,1% TFA (gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) äquilibriert. Die Proben wurden in 70 µL 0,1% TFA (gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) gelöst und auf die Mikrosäule aufgetragen. Nach dem Probenauftrag wurde das Chromatographiematerial mit 60 µL 0,1% TFA (gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 20 µL 70% ACN, 0,1% TFA (gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) und die Eluate wurden anschließend zur Trockne eingedampft.

#### **9.2.1.3.3 LC-MS/MS-Analyse der tryptischen RNase A-Peptide**

Die LC-MS/MS-Analyse der tryptischen RNase A-Peptide vor und nach PIRL-Ablation wurde mit einem Q-TOF-Massenspektrometer, welches über ein ESI-Interface mit einer nanoUPLC-Anlage gekoppelt war, durchgeführt. Die entsalzten und eingedampften Proben wurden jeweils in 20 µL 0,1% FA (gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) gelöst. Für die massenspektrometrische Analyse wurden jeweils 0,1 µL der Probe injiziert. Die LC-MS/MS-Analyse erfolgte, wie in Abschnitt 9.5.2.1 beschrieben, unter Verwendung eines 30 min ACN-Gradienten. Die Identifizierung der MS/MS-Daten erfolgte durch die Suche gegen eine Säugetier-Decoydatenbank (SwissProt, UniprotKB), wie in Abschnitt 9.5.2.5 beschrieben.

Darüber hinaus wurden die LC-MS/MS-Analysen unabhängig von der Identifizierung miteinander verglichen. Dies geschah, wie in Abschnitt 0 beschrieben, unter Verwendung des Open-Source-Software-Programmiergerüsts OpenMS [86] und der integrierten Benutzeroberfläche TOPPAS (The OpenMS Proteomic Pipeline) [85]. Die Features, die nach der bioinformatischen Analyse ausschließlich im Datensatz der RNase A vor bzw. nach PIRL-Ablation vorkamen, wurden in den MS-Rohdaten manuell überprüft.

#### **9.2.1.4 Analyse der chemischen Zusammensetzung der RNase A vor und nach PIRL-Ablation auf der Proteinebene mit der MALDI-MS**

Für die Analyse der chemischen Zusammensetzung der RNase A vor und nach PIRL-Ablation auf der Proteinebene mit der MALDI-Massenspektrometrie (MALDI-MS) wurden von den intakten, unverdauten Proben jeweils 2 µL eingesetzt. Sowohl die Probenvorbereitung als auch die Parameter der MALDI-MS-Analyse sind in Abschnitt 9.5.1.1 beschrieben.

#### **9.2.1.5 Analyse der chemischen Zusammensetzung der RNase A vor und nach PIRL-Ablation auf der Proteinebene mit der LC-MS**

Neben der MALDI-MS wurden die intakten, unverdauten RNase A-Proben mit der LC-ESI-MS massenspektrometrisch analysiert. Für die LC-MS-Analyse wurde ein Q-TOF-MS verwendet, welches über ein ESI-Interface mit einer nanoUPLC-Anlage verbunden war. Die experimentellen Parameter der LC-MS-Analyse sind in Abschnitt 9.5.2.2 beschrieben. Für die

LC-MS-Analyse wurde für die ablatierten Probe ( $V = 0,7 \mu\text{L}$ ) und für die nicht-ablatierten Probe ( $V = 0,4 \mu\text{L}$ ) das injizierte Probenvolumen so angepasst, dass die Basis-Peak-Chromatogramme für die Analyten vergleichbare Signalintensitäten zeigten. Für die manuelle Interpretation und den Vergleich der LC-MS-Daten wurde das Programm MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, UK) verwendet. Die Parameter für die Glättung der MS- und MS/MS-Spektren sowie für die Erstellung der extrahierten Ionenchromatogramme (EIC) und die spektrale Dekonvolution sind in Abschnitt 0 beschrieben.

## **9.2.2 Analyse der chemischen Zusammensetzung von Phosphoproteinen vor und nach PIRL-Ablation**

Um zu untersuchen, ob instabile posttranslationale Modifizierungen den PIRL-DIVE-Prozess intakt überstehen, wurden die Phosphoproteine Alpha-S1-, Alpha-S2- und Beta-Casein vor und nach PIRL-Ablation auf der Proteinebene sowie nach erfolgter Phosphopeptidanreicherung auf der Peptidebene massenspektrometrisch analysiert.

### **9.2.2.1 PIRL-Ablation von Alpha-S1-, Alpha-S2- und Beta-Casein**

Für die PIRL-Ablation wurde eine Alpha-S1/Alpha-S2-Casein-Lösung ( $c = 1,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , gelöst in 0,1% FA, 99,9% HPLC- $\text{H}_2\text{O}$ , im weiteren Verlauf dieses Kapitels Lösung A genannt) sowie eine Beta-Casein-Lösung ( $c = 1,3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , im weiteren Verlauf dieses Kapitel Lösung B genannt) hergestellt. Darüber hinaus wurde eine Lösung hergestellt, in der sowohl die Alpha-Caseine als auch das Beta-Casein gemeinsam vorlagen ( $c = 1,25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , im weiteren Verlauf dieses Kapitels Lösung C genannt). Für die Ablationsexperimente wurden von den Lösungen A, B und C jeweils  $200 \mu\text{L}$  mit dem PIRL ablatiert (Abschnitt 9.1). Die Ablationsprodukte wurden mit Hilfe von C8-RP-Membranen, wie in Abschnitt 9.2.1.1 beschrieben, aufgefangen. Die Elution von den C8-RP-Membranen wurde, wie in Abschnitt 9.2.1.2 beschrieben, durchgeführt. Als Kontrollproben wurde von der Lösung A, B und C jeweils  $200 \mu\text{L}$  auf eine zuvor konditionierte und äquilibrierte C8-RP-Membran gegeben. Die Lösungen wurden unter Verwendung einer Membranpumpe über die C8-RP-Membran gesogen und ebenfalls, wie in Abschnitt 9.2.1.2 beschrieben, von der Membran eluiert. Nach der Elution wurden die Eluate zur Trockne eingedampft und für die weiteren Experimente in  $20 \mu\text{L}$  0,1% FA (gelöst in HPLC- $\text{H}_2\text{O}$ ) gelöst.

### 9.2.2.2 Analyse der intakten Alpha- und Beta-Caseine mit der MALDI-MS

Sowohl die ablatierten als auch die nicht-ablatierten Proben der Alpha- (Lösung A) und Beta-Casein-Lösung (Lösung B) wurden mit der MALDI-MS massenspektrometrisch analysiert. Für die MALDI-MS-Analysen wurden von den Proben jeweils 2 µL eingesetzt. Sowohl die Probenvorbereitung als auch die Parameter der MALDI-MS-Analyse sind in Abschnitt 9.5.1.1 beschrieben.

### 9.2.2.3 Anreicherung der Phosphopeptide mit der TiO<sub>2</sub>-Affinitätschromatographie

Von der Alpha-Beta-Casein-Probe (Lösung C) vor und nach PIRL-Ablation wurden jeweils 5 µL in 295 µL HPLC-H<sub>2</sub>O gelöst und für einen tryptischen Verdau in Lösung eingesetzt. Die experimentelle Durchführung des tryptischen Verdau ist in Abschnitt 9.2.1.3.1 beschrieben. Im Anschluss an den tryptischen Verdau wurde sowohl die ablatierte als auch die nicht-ablatierte Probe zur Trockne eingedampft, in 70 µL 0,1% FA (gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) gelöst und, wie in Abschnitt 9.2.1.3.2 beschrieben, entsalzt. Die Eluate der Entsalzungen wurden zur Trockne eingedampft und für die Anreicherung der Phosphopeptide mit der TiO<sub>2</sub>-Affinitätschromatographie in 35 µL Ladungspuffer (1 M Glycolsäure, 5% TFA, 80% ACN, gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) aufgenommen.

Die Anreicherung der Phosphopeptide erfolgte durch die Verwendung von selbstgepackten TiO<sub>2</sub>-Mikrosäulen. Zur Herstellung der Mikrosäule wurde zunächst, wie in Abschnitt 9.2.1.3.2 beschrieben, ein Adapter angefertigt. Mit Hilfe einer 10 µL-Pipettenspitze wurde eine C8-Fritte aus einer C8-RP-Extraktionsmembran ausgestanzt. Die ausgestanzte Fritte wurde mit einer Fused-Silica Kapillare (Außendurchmesser 360 µm) in das sich verjüngende Ende des einer 10 µL-Pipettenspitze (GELoader, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) platziert. Die Fritte wurde anschließend mit 20 µL 100% ACN gewaschen. Anschließend wurden 25 µL der Lösung mit dem TiO<sub>2</sub>-Chromatographiematerial (*c* = 4 mg/mL Titansphere TiO<sub>2</sub>-Bulk-Medium, GL Sciences Inc., Torrance, USA, gelöst in 100% ACN) in die 10 µL-Pipettenspitze pipettiert. Die Lösung mit dem Chromatographiematerial wurde langsam und gleichmäßig durch die Pipettenspitze gegeben und mehrmals wieder aufgeschlämmt, bis sich eine gleichmäßige, feste Packung von ungefähr 8 mm Länge oberhalb der C8-Fritte ausgebildet hatte. Vor dem Probenauftrag wurden die Mikrosäulen mit 30 µL Ladungspuffer (5% TFA, 1 M Glycolsäure,

80% ACN, gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) äquilibriert. Anschließend wurden die Proben (gelöst in 35 µL Ladungspuffer) auf die Mikrosäulen aufgetragen. Nach dem Probenauftrag wurden die Mikrosäulen mit 5 µL Ladungspuffer gewaschen. Im Anschluss wurden die Mikrosäulen mit 30 µL Waschpuffer (1% TFA, 80% ACN, gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) gewaschen. Die Elution der Phosphopeptide erfolgte im Alkalischen mit 20 µL 10% NH<sub>4</sub>OH (gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O). Unmittelbar nach der Elution wurde das Eluat mit 2 µL 30% FA angesäuert, bevor eine zweite Elution mit 5 µL 30% ACN (gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) erfolgte. Die Proben wurden nach der Elution zur Trockne eingedampft und im Anschluss wie in Abschnitt 9.2.2.4 beschrieben entsalzt.

#### **9.2.2.4 Entsatzung der angereicherten Phosphopeptide und MALDI-MS-Analyse**

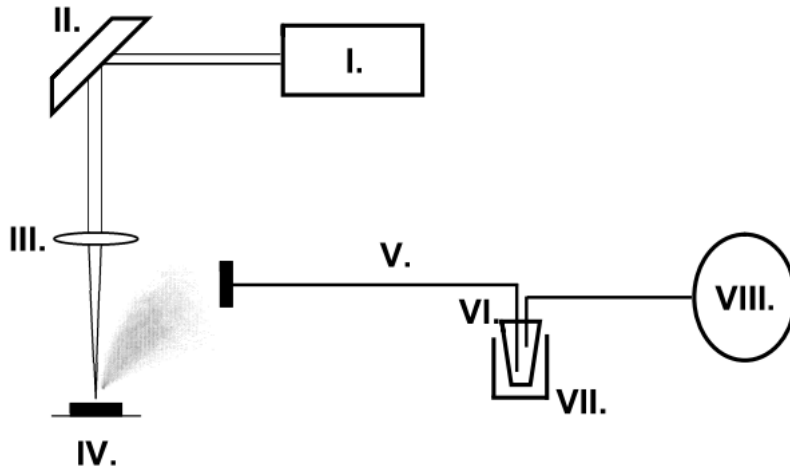
Die eingedampften Eluate der Phosphopeptidanreicherung (Abschnitt 9.2.2.3) wurden in 70 µL 0,1% TFA (gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) gelöst und mit jeweils mit einer RP-Mikrosäule entsalzt. Die Mikrosäule wurde, wie in Abschnitt 9.2.1.3.2 beschrieben, hergestellt. Die Proben wurden auf die Mikrosäulen mit Hilfe der 1 mL Spritze aufgetragen. Nach dem Probenauftrag wurde das Chromatographiematerial mit 60 µL 0,1% TFA (gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 1 µL MALDI-Matrix (20 mg/mL 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), 50% ACN, 0,1% TFA, 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) direkt auf einen MALDI-Probenteller. Anschließend wurden die angereicherten Phosphopeptide massenspektrometrisch mit der MALDI-MS analysiert, wie in Abschnitt 9.5.1.2 beschrieben.

### **9.3 Experimente zur Untersuchung der Enzymaktivitäten von PIRL-ablatierten Proteinen**

Um zu untersuchen, ob Proteine, die mit dem PIRL ablatiert wurden, ihre enzymatische Aktivität behalten, wurden Trypsin und humanes Blutplasma ablatiert und mit Alpha-Casein bzw. Angiotensin I (Ang 1-10) inkubiert und massenspektrometrisch analysiert.

Im Vergleich zu den vorangegangenen Experimenten wurden die Ablationsprodukte nicht mit einer C8-RP-Membran, sondern mit einer Kühlfalle und flüssigem Stickstoff aufgefangen (Abbildung 41). Bei der Kühlfalle handelte es sich um eine selbstkonstruierte Einweg-Waschflasche (15 mL Reaktionsgefäß, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland). Die Waschflasche war mit zwei Teflon-Schläuchen ausgestattet. Der eine Schlauch war mit einer

Membranpumpe verbunden, wobei der zweite Schlauch in einem Trichter nahe dem Probengefäß für die PIRL-Ablation mündete. Durch den Sog der Membranpumpe wurden die Ablationsprodukte über den Trichter und den Schlauch in die Waschflasche transportiert. Die Analyten wurden in der Waschflasche durch den flüssigen Stickstoff, der die Waschflasche umgab, ausgefroren.



**Abbildung 41: Schematische Darstellung der Kühlfalle, welche verwendet wurde, um die Produkte der PIRL-DIVE-Ablation aufzufangen.** I. PIRL II. optischer Spiegel III. optische Linse zur Fokussierung des PIRL IV. Probenhalterung V. Teflonschlauch mit Trichter am vorderen Ende VI. Waschflasche VII. Kühlfalle mit flüssigen N<sub>2</sub> VIII. Membranpumpe. Abbildung nach Kwiatkowski *et al.* [41].

### 9.3.1 Untersuchung der enzymatischen Aktivität von Trypsin nach PIRL-Ablation

Für die Untersuchung der Enzymaktivität von Proteinen nach PIRL-Ablation wurde Trypsin (non-sequencing grade Trypsin, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) als Modelprotein mit dem PIRL ablatiert.

#### 9.3.1.1 PIRL-Ablation von Trypsin

Für die Untersuchung wurde eine Trypsin-Lösung ( $c = 4,55 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , gelöst in  $100 \text{ mM NH}_4\text{HCO}_3$ ) hergestellt. Von der Lösung wurden  $300 \mu\text{L}$  in ein Probengefäß überführt und mit dem PIRL ablatiert (Abschnitt 9.1). Die Ablationsprodukte wurden mit der oben beschriebenen Kühlfalle aufgefangen (Abbildung 41, Abschnitt 9.3) und sofort ausgefroren (PIRL-DIVE-Kondensat).



### 9.3.1.2 Inkubation der ablatierten Trypsin-Moleküle mit Alpha-S1/S2-Casein

Von dem Kondensat der Trypsinablation (Abschnitt 9.3.1.1) wurde 1  $\mu\text{L}$  für einen tryptischen Verdau von Alpha-S1/S2-Casein eingesetzt. Für den tryptischen Verdau in Lösung wurden 2,9 mg Alpha-S1/S2-Casein in 100  $\mu\text{L}$  6 M Harnstoff gelöst. Im Anschluss wurden zu der Lösung 2,3  $\mu\text{L}$  100 mM Dithiothreitol (DTT, gelöst in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) hinzugegeben, um die Disulfidbrücken zu reduzieren. Die Inkubation der Lösung erfolgte für 10 min bei 56°C. Nach der Inkubation wurden die Sulfhydrylgruppen der Cysteine irreversibel alkyliert. Die Alkylierung erfolgte durch Zugabe von 2,3  $\mu\text{L}$  300 mM Iodacetamid (IAA, gelöst in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) und einer Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT) für 30 min. Anschließend wurde der Lösung 850  $\mu\text{L}$  100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (gelöst in HPLC- $\text{H}_2\text{O}$ ) hinzugegeben. Für den tryptischen Verdau wurde 1  $\mu\text{L}$  des PIRL-DIVE-Kondensats in 79  $\mu\text{L}$  Trypsin-Resuspensionspuffer (Promega, Mannheim, Deutschland) gelöst und zu der Alpha-S1/S2-Casein-Lösung hinzugegeben. Der tryptische Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C. Zum Abstoppen des Verdau wurden 2,1  $\mu\text{L}$  100% FA zu der Lösung hinzugegeben und das Volumen der Lösung mit HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  auf 1050  $\mu\text{L}$  eingestellt ( $c_{\text{FA}} = 0,2\%$ ). Die Probe wurde anschließend zur Trockne eingedampft.

### 9.3.1.3 Inkubation von Alpha-S1/S2-Casein mit Trypsin-Resuspensionspuffer

Als Kontrolle wurden ebenfalls 2,9 mg Alpha-S1/S2-Casein, wie oben beschrieben, in 100  $\mu\text{L}$  6 M Harnstoff gelöst und durch die Zugabe von jeweils 2,3  $\mu\text{L}$  100 mM DTT und 300 mM IAA (beides gelöst in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) reduziert bzw. alkyliert. Anschließend wurden der Lösung 850  $\mu\text{L}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  hinzugegeben. Die Probe wurde nach der Zugabe von 80  $\mu\text{L}$  Trypsin-Resuspensionspuffer, der kein Trypsin enthielt, über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde durch die Zugabe von 2,1  $\mu\text{L}$  100% FA abgestoppt. Das Volumen der Lösung wurde durch die Zugabe von HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  auf 1050  $\mu\text{L}$  eingestellt ( $c_{\text{FA}} = 0,2\%$ ). Die Probe wurde anschließend zur Trockne eingedampft.

### 9.3.1.4 Entsalzung der Inkubate mit der RP-Chromatographie

Die eingedampften Proben - Inkubation von Alpha-S1/S2-Casein mit dem ablatierten Trypsin bzw. dem Trypsin-Resuspensionspuffer, der kein Trypsin enthielt - wurden in 70  $\mu\text{L}$  0,1% TFA

gelöst und, wie in Abschnitt 9.2.1.3.2 beschrieben, entsalzt. Die Eluate der Entsalzungen wurden zur Trockne eingedampft.

#### **9.3.1.5 LC-MS/MS Analyse der Inkubate**

Die entsalzten und eingedampften Inkubate wurden in jeweils 100 µL 0,1% FA (gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) gelöst. Die Inkubate wurden massenspektrometrisch per LC-MS/MS mit einem ESI-Q-TOF-Massenspektrometer analysiert. Die experimentellen Parameter der LC-MS/MS-Analyse sind in Abschnitt 9.5.2.1 wiedergegeben. Für die LC-MS/MS-Messungen wurden jeweils 0,1 µL der Inkubate injiziert und die Analyten wurden mit einem 30 min ACN-Gradient voneinander getrennt.

Die Identifizierung der MS/MS-Daten erfolgte durch die Suche gegen eine Säugetier-Decoydatenbank (SwissProt, UniprotKB), wie in Abschnitt 9.5.2.5 beschrieben. Zusätzlich wurden die LC-MS-Daten manuell analysiert und miteinander verglichen.

### **9.3.2 Untersuchung der enzymatischen Aktivität von Angiotensin-I-metabolisierenden Enzymen nach der PIRL-Ablation von humanem Blutplasma**

#### **9.3.2.1 Gewinnung von humanem Blutplasma**

Von einem gesunden humanen Probanden (Alter: 53 Jahre, Blutdruck: normal, <120/80 mmHg) wurden mit Hilfe einer 9 mL 3,13%igem Natriumcitrat gefüllten Perfusionsspritze aus der Cubitalvene 50 mL entnommen. Das Blut wurde anschließend mit 1 mL Proteaseinhibitor-Lösung (2 mM 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid, 0,3 µM Aprotinin, 130 µM Bestatin, 1 mM EDTA, 14 µM E-64, 1 µM Leupeptin) vermischt. Anschließend wurde das Blut sofort in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für 15 min mit 4000 x g bei 4°C zentrifugiert (Kühlzentrifuge 4-16K, Sigma, Osterode, Deutschland). Das abgetrennte Plasma wurde abgenommen, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### **9.3.2.2 PIRL-Ablation von humanem Blutplasma**

Für die PIRL-Ablation wurden 300 µL humanes Blutplasma in ein Probengefäß überführt und, wie in Abschnitt 9.1 beschrieben, ablatiert. Die Ablationsprodukte wurden mit Hilfe einer

Kühlfalle und flüssigen N<sub>2</sub> aufgefangen. Die Proteinkonzentration des PIRL-DIVE-Kondensats wurde mit einem NanoDrop 1000 Spektralphotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt. Als zusätzliche Kontrolle wurde die Umgebungsluft für 5 min mit Hilfe der Membranpumpe eingesogen und in der Kühlfalle mit flüssigem Stickstoff ausgefroren. Die Proteinbestimmung des Kondensats der Umgebungsluft wurde ebenfalls mit einem NanoDrop 1000 Spektralphotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) durchgeführt.

### **9.3.2.3 Inkubation von ablatierten humanen Blutplasma mit Ang 1-10**

Um zu untersuchen, ob Angiotensin I metabolisierende Proteasen nach der PIRL-DIVE-Extraktion ihre enzymatische Aktivität behalten hatten, wurden 4,75 µg der ablatierten humanen Plasmaproteine mit Angiotensin I (Ang 1-10,  $c = 10^{-5}$  M, gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) bei 37°C auf einem Rotor inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten (0 h, 6 h und 24 h) wurden Aliquots mit einem Volumen von 3 µL abgenommen und in 27 µL 0,1% FA (gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) gelöst.

### **9.3.2.4 Inkubation von nicht-ablatierten humanen Blutplasma mit Ang 1-10**

Als Vergleichsprobe (Kontrolle) wurde nicht-ablatiertes humanes Plasmaserum verwendet. Die Proteinkonzentration wurde mit einem NanoDrop 1000 Spektralphotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt und 4,75 µg Plasmaproteine mit Ang 1-10 ( $c = 10^{-5}$  M, gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) bei 37°C auf einen Rotor inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten (0 h, 6 h und 24 h) wurden Aliquots mit einem Volumen von 3 µL entnommen und in 27 µL 0,1% FA (gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) gelöst.

### **9.3.2.5 Inkubation der ausgefrorenen Umgebungsluft mit Ang 1-10**

Als zusätzliche Kontrolle wurden 10 µL von dem Kondensat der ausgefrorenen Umgebungsluft mit Ang 1-10 ( $c = 10^{-5}$  M, gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) bei 37°C auf einen Rotor inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten (0 h, 6 h und 24 h) wurden Aliquots mit einem Volumen von 3 µL entnommen und in 27 µL 0,1% FA (gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) gelöst.

### **9.3.2.6 MALDI-MS-Analyse der Reaktionsprodukte der Ang 1-10-Inkubation mit humanem Blutplasma vor und nach PIRL-Ablation und der Umgebungsluft**

Die Reaktionsprodukte der Ang 1-10-Inkubation mit humanem Blutplasma vor und nach PIRL-Ablation sowie der ausgefrorenen Umgebungsluft wurden mit der MALDI-MS massenspektrometrisch analysiert. Hierfür wurden für die einzelnen Inkubationszeitpunkten jeweils 0,5 µL der MALDI-Matrix (20 mg/mL DHB, 30:70 [v/v] ACN: 0.1% TFA, gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) auf einen MALDI-Probenteller vorgelegt und 0,5 µL der jeweiligen Proben-Lösung hinzugegeben. Die Parameter der MALDI-MS-Analyse sind in Abschnitt 9.5.1.2 wiedergegeben.

## **9.4 Experimente zur Gewinnung von Proteinen aus Geweben mittels PIRL-Ablation**

### **9.4.1 Experimente mit murinen Gewebeproben**

Um zu überprüfen, ob Proteine durch die PIRL-Ablation aus Geweben freigesetzt werden, wurden verschiedene Gewebe mit dem PIRL bestrahlt. Die Ablationsprodukte wurden mit einer Kühlfalle aufgefangen und die Kondensate mit unterschiedlichen Methoden der Protein- und Proteomanalytik untersucht.

#### **9.4.1.1 PIRL-Ablation von murinen Muskel- und Lebergewebe**

Einer Maus (männlich, 16 Wochen, C57BL7/6) wurden nach Asphyxie und zervikaler Dislokation die Leber und der Oberschenkelmuskel entnommen. Die Maus wurde in der spezifisch pathogenfrei (SPF) zertifizierten und keimfreien Facility am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf gehalten und ad libitum gefüttert. Alle Tierexperimente wurden von der lokalen Tierschutzbehörde und der Ethikkommission (Behörde Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz, Hamburg) genehmigt. Für die Ablationsexperimente wurden die Gewebeproben auf einen Probenblock der Ablationskammer positioniert und jeweils eine Fläche von 5 mm x 5 mm für 5 min mit dem PIRL ablatiert. Die Parameter des PIRL sind in Abschnitt 9.1 beschrieben. Die Ablationsprodukte wurden mit einer Kühlfalle und flüssigen N<sub>2</sub>, wie in Abschnitt 9.3 beschrieben, aufgefangen (Abbildung 41). Die Proteinkonzentration der ablatierten Gewebeproben wurde mit einem NanoDrop 1000 Spektralphotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt.

#### 9.4.1.2 Eindimensionale Gelelektrophorese der PIRL-DIVE-Kondensate

Für die SDS-PAGE wurden 7,5 µL von dem PIRL-DIVE-Kondensat des Mausmuskels ( $c=19,33 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) und 2 µL von dem PIRL-DIVE-Kondensat der Mausleber ( $c=20,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) in jeweils 5 µL 4x MES-Probenpuffer, 1 µL 20x Reduzierungsreagenz (jeweils Bio-Rad, München, Deutschland) gelöst und mit HPLC-H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 20 µL aufgefüllt. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C inkubiert und auf ein 10%iges Bis-Tris Gel (Criterion™ XT Bis-Tris Gel, Bio-Rad, München, Deutschland) geladen. Als Proteinstandard wurden 7,5 µL Precision Plus Protein™ Dual Color (Bio-Rad, München, Deutschland) auf das Gel aufgetragen. Die Trennung der Proteine erfolgte für 45 min bei einer konstanten Spannung von 120 V. Das Gel der SDS-PAGE des Mausmuskels wurde über Nacht Stunden mit einer Coomassie-Lösung (40% MeOH, 10% Essigsäure, 0,025 % Coomassie blue-250, gelöst in H<sub>2</sub>O) bei RT auf einem Schüttler gefärbt. Im Anschluss wurde das Gel mit einer 40%igen MeOH-Lösung (gelöst in H<sub>2</sub>O) auf einem Schüttler bei RT entfärbt. Einzelne Banden des Gels wurden für die LC-MS/MS-Analyse mit Trypsin verdaut. Die experimentelle Durchführung des tryptischen In-Gel-Verdaus ist in Abschnitt 9.4.3 beschrieben und die Parameter der LC-MS/MS-Analyse in Abschnitt 9.5.2.1. Die Peptide wurden in der LC-MS/MS-Analyse mit einem 30 min Gradienten voneinander getrennt und, wie in Abschnitt 9.5.2.5 beschrieben, identifiziert. Die Gelelektrophorese des Leberkondensats wurde für die Western Blot Analyse, wie in Abschnitt 9.4.1.3 beschrieben, auf eine Blotmembran transferiert.

#### 9.4.1.3 Western Blot Analyse

Der Transfer auf die Blotmembran und die Detektion des CEACAM 1 Proteins mit dem "P1 rabbit polyclonal anti-CEACAM1"-Antiserum wurde im Arbeitskreis von Frau PD Dr. Andrea Horst, wie in der Publikation von Horst *et al.* beschrieben, durchgeführt [44].

#### 9.4.1.4 Konventionelle Proteinextraktion des Mausmuskels

Ein kleines Stück Gewebe (5 mm x 5 mm und 1,5 mm Tief) wurde mit einem Skalpell aus dem Oberschenkelmuskel einer Maus entfernt und sofort in flüssigen N<sub>2</sub> überführt. Das gefrorene Gewebestück wurde anschließend lyophilisiert. Nach der Lyophilisierung wurde das Gewebe mit einem Mörser und einem Pistill auf Eis in Gegenwart von flüssigen N<sub>2</sub> homogenisiert. Das

Homogenat wurde für 30 min im Lysepuffer (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 1% Triton, 10 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM Glycerolphosphat, Roche complete Proteaseinhibitor) auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde das Lysat für 20 min bei 14680 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration mit einem NanoDrop 1000 Spektralphotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt.

#### **9.4.2 Experimente mit humanen Tonsillen**

Um zu untersuchen, ob sich die Proteomzusammensetzung unterscheidet, wenn die Proteine durch die PIRL-Ablation aus dem Gewebe freigesetzt werden (PIRL-DIVE-Homogenat, DH) oder wenn das Gewebe konventionell homogenisiert wurde, wurden von humanen Tonsillen mit Hilfe von PIRL-DIVE (DH) und einem Kryomörser (mechanisches Homogenat, MH) Homogenate hergestellt. Aus den Homogenaten wurden unter vergleichbaren Bedingungen Proteinextrakte gewonnen. Mit den Proteinextrakten wurde anschließend eine differentielle Proteomanalytik durchgeführt.

##### **9.4.2.1 Gewinnung humaner Tonsillen und histologische Untersuchung**

Von drei Patienten wurde während einer Tonsillektomie, die von Herrn Dr. med. Hannes Petersen am UKE durchgeführt wurde, jeweils eine humane Tonsille entnommen. Direkt im Anschluss an die Tonsillektomie wurden die Tonsillen geteilt und in jeweils zwei Stücke mit einer Dimension von ungefähr 5 mm x 5 mm und 2 mm Tiefe für die mechanische Homogenisierung und für die PIRL-Ablation geschnitten. Die Proben wurden anschließend sofort in flüssigen Stickstoff überführt und im Anschluss bei -80 °C gelagert. Von der gegenüberliegenden Seite wurden Schnitte für die histologische Untersuchung verwendet. Die histologische Färbung wurde im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher durchgeführt. Für die histologische Färbung wurden die Gewebeproben in einem PBS-Puffer mit 3,5% Formaldehyd fixiert. Die Proben wurden in Paraffin eingebettet. Von jeder Probe wurden Schnitte angefertigt, die eine Schichtdicke von 4 µm besaßen. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Merck, Darmstadt, Germany) erfolgte wie im Romeis beschrieben [142]. Die gefärbten Proben wurden mit dem MIRAX SCAN-System (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena, Germany) analysiert.

#### 9.4.2.2 PIRL-Ablation humaner Tonsillen

Die Gewebeproben wurden auf dem Probenblock der Ablationskammer positioniert. Mit dem PIRL wurde jeweils eine Fläche von 5 mm x 5 mm für 3 min ablatiert. Die Parameter des PIRL sind in Abschnitt 9.1 beschrieben. Die Ablationsprodukte wurden mit einer Kühlfalle und flüssigem N<sub>2</sub>, wie in Abschnitt 9.3 beschrieben, aufgefangen (Abbildung 41). In der Kühlfalle befand sich jeweils eine Waschflasche, in der sich ein Feststoff-Pulvergemisch aus Harnstoff (m= 210,21 mg), Thioharnstoff (76,12 mg) und Tris (m= 1,82 mg) befand. Die gewonnenen Kondensate wurden in Gegenwart des Pulvergemisches aufgetaut. Der pH-Wert der Lösungen wurde mit 0,1 M Salzsäure (HCl) auf 7,8 eingestellt und die Lösungen mit HPLC-H<sub>2</sub>O und 1,23 µL 2-Hydroxyethyl-disulfid (HED) auf ein Volumen von V= 500 µL aufgefüllt (C<sub>Harnstoff</sub>= 7 M, C<sub>Thioharnstoff</sub>= 2 M, C<sub>Tris-HCl</sub>= 30 mM, pH 7,8, C<sub>HED</sub>= 20 mM, PIRL-DIVE-Homogenat, DH).

#### 9.4.2.3 Mechanische Homogenisierung humaner Tonsillen

Die Gewebeproben wurden lyophilisiert und anschließend auf Eis in Gegenwart von Stickstoff mit einem Kryomörser pulverisiert. Die pulverisierten Homogenate wurden jeweils in 500 µL Lysepuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 30 mM Tris-HCl, pH 7,8, 20 mM HED, gelöst in HPLC-H<sub>2</sub>O) gelöst.

#### 9.4.2.4 Gewinnung eines Proteinextrakts aus dem PIRL-DIVE-Homogenat und dem mechanischen Homogenat

Die Homogenate der PIRL-Ablation und der mechanischen Homogenisierung wurden für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben für 5 min bei 15000 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände abgenommen und jeweils in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine Proteinpräzipitation und Proteinbestimmung mit dem 2-D Quant Kit (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland). Die Präzipitation und Proteinbestimmung erfolgte entsprechend der Vorschrift des Herstellers. Die Kalibriergeraden und Proteinbestimmungen sind in Abbildung 43 bis Abbildung 45 im Anhang dargestellt.

#### **9.4.2.5 Eindimensionale Gelelektrophorese der Proteinextrakte der PIRL-DIVE-Homogenisierung und der mechanischen Homogenisierung**

Von den Proteinextrakten der PIRL-DIVE-Homogenate und der mechanischen Homogenate wurden jeweils 40 µg für die SDS-PAGE verwendet. Die Probenvorbereitung und die Gelelektrophorese erfolgte wie in Abschnitt 9.4.1.2 beschrieben. Als Proteinstandard wurden 7,5 µL SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland) verwendet. Die Gelelektrophoresen der PIRL-DIVE-Homogenate und der mechanischen Homogenate wurden in miteinander vergleichbare Banden unterteilt und für den tryptischen In-Gel-Verdau ausgeschnitten (Abbildung 49). Der tryptische In-Gel-Verdau wurde, wie in Abschnitt 9.4.3 beschrieben, durchgeführt. Die tryptischen Peptide wurden unter vergleichbaren Bedingungen, wie in Abschnitt 0 und 9.5.2.7 beschrieben, massenspektrometrisch analysiert und bioinformatisch ausgewertet.

#### **9.4.2.6 Zweidimensionale Gelelektrophorese der Proteinextrakte der PIRL-DIVE-Homogenisierung und der mechanischen Homogenisierung**

Von dem Proteinextrakt des PIRL-DIVE-Homogenats und des mechanischen Homogenats der humanen Tonsille Nr. 1 wurden jeweils 200 µg für eine zweidimensionale Gelelektrophorese verwendet. Die zweidimensionale Gelelektrophorese wurde von Frau Dr. Karola Lehmann in der Proteome Factory (Berlin, Deutschland) nach dem Protokoll von Kobaltz und Klose durchgeführt [143]. Die isoelektrische Fokussierung wurde in der ersten Dimension mit einem vertikalen Rundgel in 9 M Harnstoff, 4% Acrylamid, 0,3% 1,4-Diacrylopipezin, 5% Glycerin, 2% Ampholyten-Lösung (pH 2-11), 0,006% TEMED und 0,08% Ammoniumpersulfat durchgeführt. Die Proteinextrakte wurden bis 8820 Voltstunden fokussiert. In der zweiten Dimension erfolgte eine SDS-PAGE (0,1 cm, 20 cm, 30 cm, 15% Acrylamid, 0,2% Bisacrylamid, 375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% SDS, 0,03% TEMED und 0,08% Ammoniumpersulfat). Die 2DE-Gele wurden mit einer Silber-Lösung (FireSilver, Proteome Factory, Berlin, Deutschland) gefärbt. Für die LC-MS/MS-Analyse wurden die Spots ausgestanzt und, wie in Abschnitt 9.4.3 beschrieben, tryptisch verdaut. Die tryptischen Peptide wurden unter vergleichbaren Bedingungen, wie in Abschnitt 0 und 9.5.2.7 beschrieben, massenspektrometrisch analysiert und bioinformatisch ausgewertet.



### 9.4.3 Tryptischer In-Gel-Verdau

Der tryptische In-Gel-Verdau wurde durchgeführt wie von Shevchenko *et al.* beschrieben [144]. Die Gelstücke wurden abwechseln geschrumpft und gequellt unter Verwendung von 100% ACN bzw. 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (gelöst in HPLC- $\text{H}_2\text{O}$ ). Die Reduzierung und Alkylierung erfolgte durch 10 mM DTT (gelöst in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , gelöst in HPLC- $\text{H}_2\text{O}$ ) bzw. 55 mM IAA (gelöst in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , gelöst in HPLC- $\text{H}_2\text{O}$ ). Für den tryptischen Verdau wurden die Gelstücke mit einer Trypsin-Lösung ( $c = 13 \text{ ng}/\mu\text{L}$  Trypsin sequencing-grade, Promega, Mannheim, Deutschland, gelöst in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 10% ACN, gelöst in HPLC- $\text{H}_2\text{O}$ ) bedeckt und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Peptide mit 5% FA, 50% ACN (gelöst in HPLC- $\text{H}_2\text{O}$ ) extrahiert und anschließend zur Trockne eingedampft. Für die LC-M/MS-Analyse wurden die eingedampften Proben in  $20 \mu\text{L}$  0,1% FA (gelöst in HPLC- $\text{H}_2\text{O}$ ) gelöst.

## 9.5 Massenspektrometrische Analyse

### 9.5.1 MALDI-MS

Die MALDI-MS-Analysen wurden mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer (Reflex IV, Bruker, Bremen, Deutschland) durchgeführt. Das MALDI-MS war mit einem  $\text{N}_2$ -Laser ausgestattet und alle Messungen wurden im positiven Ionenmodus durchgeführt.

#### 9.5.1.1 MALDI-MS-Analyse intakter Proteinen

Die MALDI-MS-Analyse der intakten Proteine erfolgte im linearen TOF-Modus. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 7 dargestellt. Als Matrix wurde für die Messungen, wenn nicht anders beschrieben, 2,5-Dihydroxyacetophenon (DHAP) verwendet. Für die Matrixpräparation wurden 7,6 mg DHAP in  $375 \mu\text{L}$  EtOH gelöst. Die Lösung wurde für 1 min geschüttelt und danach für 15 min sonifiziert. Im Anschluss wurde der Lösung  $125 \mu\text{L}$  Diammoniumhydrogencitrat hinzugegeben. Von der zu analysierenden Probe wurden  $2 \mu\text{L}$  in ein  $0,5 \text{ mL}$  Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt und mit  $2 \mu\text{L}$  2% TFA (gelöst in HPLC- $\text{H}_2\text{O}$ ) und  $2 \mu\text{L}$  der DHAP-Lösung vermischt. Eine  $10 \mu\text{L}$ -Pipettenspitze wurde in die Lösung eingetaucht und durch das Reiben an der Oberfläche des Reaktionsgefäßes bildeten sich in der Lösung Kristallisationskeime aus. Nachdem die Lösung eine milchige

Trübung angenommen hatte, wurde 1  $\mu\text{L}$  der Proben-Lösung auf einen MALDI-Probenteller (MTP 384 ground stell, Bruker, Bremen, Deutschland) überführt.

### 9.5.1.2 MALDI-MS-Analyse von Peptiden

Die MALDI-MS-Analysen der angereicherten Casein-Phosphopeptide (9.2.2.3), der Reaktionsprodukte der Inkubation von humanem Blutplasma vor und nach PIRL-Ablation sowie der ausgefrorenen Umgebungsluft mit Ang 1-10 (9.3.2) erfolgte im Reflektor-TOF-Modus. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 7 wiedergegeben. Für die Kalibrierung wurde der Peptidstandard I Mono (Bruker, Bremen, Deutschland) verwendet. Der Peptidstandard wurde nach Vorschrift des Herstellers in 175  $\mu\text{L}$  0,1% TFA gelöst. Für die Kalibrierung wurde 1  $\mu\text{L}$  der verwendeten MALDI-Matrix auf den MALDI-Probenteller (MTP 384 ground stell, Bruker, Bremen, Deutschland) vorgelegt und 1  $\mu\text{L}$  der Kalibrier-Lösung dazu pipettiert.

**Tabelle 7: Parameter der MALDI-MS-Analyse im Linear- und Reflektor-TOF-Modus**

Parameter	Linear-TOF-Modus	Reflektor-TOF-Modus
Laserschüsse pro Einzelspektrum	20	20
Laserintensität	30%	35-40%
Laserfrequenz	6,6 Hz	8,2 Hz
Basisliniensubtraktion	aus	aus
Matrix-Suppression	bis 1000 m/z	bis 550 m/z
Polarität	positiv	positiv
gepulste Ionenextraktion	400 ns	400 ns
Spannung Ionenquelle 1	20 kV	20 kV
Spannung Ionenquelle 2	17,85 kV	16,35 kV
Linsenspannung	7 kV	9 kV
Reflektion	aus	ein
Reflektorspannung	aus	23 kV
Massenbereich	500-30000 m/z	0-3500 m/z
Detektorverstärkung (Reflektor)	aus	6,9x
Elektronische Verstärkung	400 mV	100 mV

## 9.5.2 LC-ESI-MS

### 9.5.2.1 LC-ESI-Q-TOF-MS/MS

Die Analysen erfolgten mit einer nanoUPLC-Anlage (nanoACQUITY UPLC, Waters, UK), die über eine ESI-Quelle mit einem Q-TOF-MS-System (Q-TOF Premier, Micromass/Waters, UK) gekoppelt war. Die Proben wurden mit einer Flussrate von 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  und 2% Puffer B auf die Vorsäule (nanoACQUITY UPLC-Säule, C18, 180  $\mu\text{m} \times 20 \text{ mm}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , Waters, Manchester, UK, Puffer A: 99,9% HPLC- $\text{H}_2\text{O}$ , 0,1% FA, Puffer B: 99,9% ACN, 0,1% FA) aufgetragen. Nach dem Probenauftrag wurde die Vorsäule für 5 min mit einer Flussrate von 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  gewaschen. Die Peptide wurden mit einer Flussrate von 200 nL/min von der Vorsäule auf die Trennsäule (nanoACQUITY UPLC-Säule, C18, 75  $\mu\text{m} \times 200 \text{ mm}$ , 1,7  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$  Waters, Manchester, UK) eluiert. Die Trennung erfolgte mit einem Gradienten von 2-50% Puffer B in 30 min (im Fall eines kurzen Gradienten) bzw. in 90 min (im Fall eines langen Gradienten). Für die Generierung des Elektrosprays wurde ein Fused-Silica-Emitter (Innendurchmesser: 10  $\mu\text{m}$ , New Objective, Woburn, USA) und eine Kapillarspannung von 1520 V verwendet. Die Temperatur der Ionisationsquelle betrug 100°C und die Spannung des Konus 40 V. Die Analyse erfolgte im DDA-Modus. Die Vorläuferionen-Spektren wurden über einen m/z-Bereich von 400-1500 m/z mit einer Scan-Rate von 0,6 s und einem Inter-Scan-Delay von 0,05 s aufgenommen. Für die Fragmentierung wurden die zwei intensivsten Signale des Vorläuferionen-Spektrums selektiert. Für die Selektion mussten die Signale entweder zweifach, dreifach oder vierfach geladen sein und eine Signalintensität von größer gleich 60 cnts (counts) besitzen. Die Fragmentspektren wurden über einen m/z-Bereich von 100-1500 m/z mit einer Scan-Rate von 0,95 s aufgenommen. Der Inter-Scan-Delay betrug 0,05 s. Für die Fragmentierung wurde eine Kollisionsrampe von 20-30 eV gefahren. Nach erfolgter Fragmentierung wurden die selektierten m/z-Werte der Vorläuferionen für 0,2 min von der Fragmentanalyse ausgeschlossen (Ausschlussfenster: +/- 2 m/z). Für die Kalibrierung wurde alle 10 s ein Fragmentspektrum des Lockspraysignals ( $c = 1 \text{ pmol}/\mu\text{L}$  [Glu1]-Fibrinopeptide B, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) bei einer Kollisionsspannung von 22 eV aufgenommen.

### 9.5.2.2 LC-ESI-Q-TOF-MS

Die Messungen der intakten RNase A-Proben erfolgte wie in Abschnitt 9.5.2.1 beschrieben. Für die RP-Trennung wurde der 90 min lange ACN-Gradient verwendet. Im Vergleich zu der in Abschnitt 9.5.2.1 beschriebenen Parametern wurden nur MS-Spektren über einen m/z-Bereich von 500-3000 m/z aufgenommen.

### 9.5.2.3 Datenprozessierung der LC-ESI-Q-TOF-MS-Rohdaten

Die manuelle Interpretation und Validierung der LC-MS-Rohdaten wurde mit MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, UK) durchgeführt. Die MS- und MS/MS-Spektren wurden unter Verwendung des Savitzky-Golay-Filters geglättet (Glättungsfenster: 3, Anzahl der Glättungen: 2). Die extrahierten Ionenchromatogramme (EICs) wurden erstellt durch die Verwendung der Halbwertsbreite (FWHM, engl.: full width at half maximum) des monoisotopischen Signals. Im Fall von Signalen, die keine Isotopenauflösung zeigten, wurde für die EIC-Generierung die Halbwertsbreite der gesamten Isotopenverteilung genutzt. Für die Erstellung dekonvolutierter Spektren wurde der Algorithmus MaxEnt1 (Waters, Manchester, UK) verwendet. Die MaxEnt1-Parameter sind in Tabelle 8 wiedergegeben.

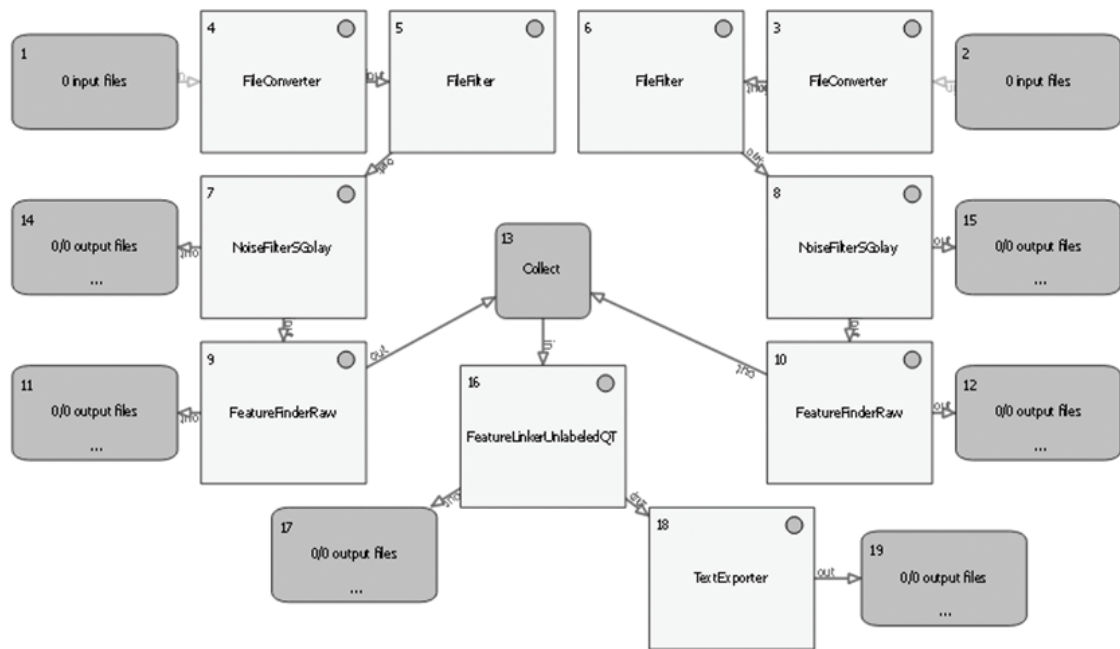
**Tabelle 8: MaxEnt1-Parameter für die Generierung von dekonvolutierten Spektren**

Parameter	Einstellung
Auflösung	0,2 Da/Kanal
gleichmäßige Gaußsche Halbwertsbreite	0,6 Da
Iteration	bis zur Konvergenz

### 9.5.2.4 Datenprozessierung der MS-Rohdaten mit OpenMS

Die MS-Rohdaten wurden mit Hilfe des massWolf-Konverters (<http://sourceforge.net/projects/sashimi/files/massWolf%20%28MassLynx%20converter%29/>) aus dem Herstellerformat \*.raw in das offene Dateiformat \*.mzXML umgewandelt. Die weitere Datenprozessierung wurde mit OpenMS [86] und der integrierten Benutzeroberfläche TOPPAS (The OpenMS Proteomic Pipeline) durchgeführt [85]. Für den

Identifizierungsunabhängigen Vergleich der LC-MS/MS-Analyse der tryptischen RNase A-Peptide wurde eine Prozessierungskette erstellt (Abbildung 42). Die zu prozessierenden Rohdaten wurden in den Input-Knoten geladen. Mit dem FileConverter wurden die \*.mzXML-Daten in \*.mzML-Daten konvertiert. Der FileFilter wurde verwendet, um die MS1-Spektren über einen Retentionszeitbereich von 1000 s bis 2000 s aus den Rohdaten zu extrahieren. Der NoiseFilterSGolay wurde verwendet, um die MS-Spektren zu glätten. Der FeatureFinderRaw wurde verwendet, um in den nicht-zentrierten LC-MS-Rohdaten Features zu detektieren. Bei einem Feature handelte es sich um ein definiertes dreidimensionales Signal in dem LC-MS-Datensatz. Dieses Signal bestand aus einem spezifischen m/z-Wert, einem spezifischen Ladungszustand, einer spezifischen Retentionszeit bzw. einem spezifischen Retentionszeitintervall und einer Intensität. Mit dem Collect-Knoten wurden die Features der Datensätze, die miteinander verglichen werden sollten, zusammengeführt, damit sie anschließend gemeinsam in einem Datensatz prozessiert werden konnten. Mit dem FeatureLinkerUnlabeledQT-Knoten wurden die Features, die in den beiden LC-MS-Läufen detektiert wurden, zusammengeführt. Die Features, welche nur in einem der beiden Datensätze detektiert wurden, wurden hierbei nicht verworfen, sondern die entsprechenden Informationen wurden mitgeführt. Mit dem TextExporter wurden die Ergebnisse des FeatureLinkerUnlabeledQT als \*.csv exportiert. Die Output-Knoten exportierten die prozessierten Daten im \*.mzML- bzw. \*.featureXML-Format- oder \*.csv-Format. Die verwendeten Parameter der einzelnen Bausteine der Prozessierungskette sind in Tabelle 9 wiedergegeben.



**Abbildung 42: TOPPAS-Prozessierungskette für den Identifizierungsunabhängigen Vergleich der nanoUPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS-Analysen der tryptischen Rnase A-Peptide.** Die einzelnen Knoten sind im Text beschrieben und die verwendeten Parameter sind in Tabelle 9 wiedergegeben.

**Tabelle 9: Parameter der einzelnen Knoten der TOPPAS-Prozessierungskette für den Identifizierungsunabhängigen Vergleich der nanoUPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS-Analysen der tryptischen Rnase A-Peptide (Abbildung 42).**

Bezeichnung	Parameter
FileConverter	Input-Format: *.mzXML Output-Format: *.mzML
FileFilter	MS-Level: MS1 RT-Bereich [s]: 1020 - 1920
NoiseFilterSGolay	Framelänge: 9 Polynomordnung: 3
FeatureFinderRaw	RT-Grenzwert [s]: 20 Intensitätsgrenzwert (cnts.): 10 Intensitäts-Korrelationskoeffizient: 0,7 Modelabweichung: 3
FeatureLinkerUnlabeledQT	RT-Abweichung [s]: 10 m/z-Abweichung [Da]: 0,05 berücksichtige Identifizierung: nein berücksichtige Ladungszustand: ja
TextExporter	Ausgabeformat: *.csv

### 9.5.2.5 Identifizierung der LC-ESI-Q-TOF-MS/MS-Analysen

Für die Identifizierung der MS/MS-Spektren wurden die Rohdaten mit Protein Lynx Global Server 2.5.2 (Waters, Manchester, UK) prozessiert. Die Rohdaten wurden mit einem Savitzky-Golay-Filter geglättet (Glättungsfenster: 3, Anzahl der Glättungen: 2). Anschließend wurden die Spektren zentriert (minimale Peakweite auf halber Höhe: 4, zentriert auf 80%) und eine Lockmass-Korrektur vorgenommen. Die Lockmass-korrigierten und zentrierten Spektren wurden für die Datenbanksuche als Peaklisten im mzML-Format exportiert. Die Peaklisten der Casein- und RNase A-Proben wurden gegen eine Säugetierdatenbank gesucht und die Peaklisten der Maus-Proben gegen eine Mausdatenbank. Die Suche erfolgte mit dem öffentlich zugänglichen Mascot-Server ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) Die Parameter der Datenbanksuche sind in Tabelle 10 wiedergegeben.

**Tabelle 10: Parameter für die Identifizierung der Fragmentspektren der LC-ESI-Q-TOF-MS/MS-Analysen**

Parameter	Einstellung
Enzym	Trypsin
Anzahl berücksichtigter verpasster Schnittstellen	2
Vorläuferionen-Massentoleranz	35 ppm
Fragmentionen-Massentoleranz	0,2 Da
berücksichtigte fixe Aminosäuremodifizierung	Carbamidomethylierung am Cystein
berücksichtigte variable Aminosäuremodifizierungen	Oxidation am Methionin, Phosphorylierung am Serin und Threonin (im Fall der Casein-Datensätze), Oxidation am Prolin (im Fall der Mausmuskel-Datensätze)
Signifikanz-Grenzwert	p= 0,05

### 9.5.2.6 LC-ESI-Q-IT-OT-MS/MS

Für die LC-MS/MS-Analyse wurden jeweils 2  $\mu\text{L}$  in das nanoUPLC-System (Dionex UltiMate 3000 RSLCnano, Thermo Scientific, Bremen, Germany) injiziert. Das nanoUPLC-System war über eine ESI-Quelle mit einem Q-IT-OT-Massenspektrometer (Orbitrap Fusion, Thermo Scientific, Bremen, Deutschland) gekoppelt. Die Proben wurden mit einer Flussrate von 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  und 2% Puffer B auf die Vorsäule (Acclaim PepMap  $\mu$ -precolumn, C18, 300  $\mu\text{m}$  x 5mm, 5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{Å}$ , Thermo Scientific, Bremen, Germany; Puffer A: 0,1% FA, gelöst in HPLC- $\text{H}_2\text{O}$ ; Puffer B: 0,1% FA, gelöst in ACN) aufgetragen. Die Vorsäule wurde nach dem Probenauftrag für 5 min mit einer Flussrate von 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  gewaschen. Die Peptide wurden mit einer Flussrate von 300 nL/min von der Vorsäule auf die Trennsäule (Acclaim PepMap 100, C18, 75  $\mu\text{m}$  x 250 mm, 2  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{Å}$ , Thermo Scientific, Bremen, Germany) eluiert. Die Trennung erfolgte mit einem Gradienten von 2-30% Puffer B in 30 min. Das Elektrospray wurde mit einem Fused-Silica-Emitter (Innendurchmesser: 10  $\mu\text{m}$ , New Objective, Woburn, USA) und eine Kapillarspannung von 1520 V erzeugt. Die Analyse erfolgte im DDA-Modus. Die Vorläuferionen-Spektren wurden über einen m/z-Bereich von 400-1300 m/z, mit einer Auflösung von 120000 (Transientenlänge: 256 ms) bei m/z 200 (FWHM, Halbwertsbreite, engl.: full width at half maximum) und einer maximalen Injektionszeit von 50 ms sowie einem AGC-Wert von  $2e5$  aufgenommen. Die Fragmentspektren wurden in der Ionenfalle mit einer Scan-Rate von 66 kDa/s, einer maximalen Injektionszeit von 200 ms und einem AGC-Wert von  $1e4$  aufgenommen. Die Fragmentierung erfolgte in der HCD-Zelle mit einer optimierten HCD-Kollisionsenergie von 28%. Die Analyse erfolgte im Top-Speed-Modus, wobei mindestens jede Sekunde ein Vorläuferionen-Spektrum aufgenommen wurde. Die fragmentierten Vorläuferionen wurden für 20 s von der Fragmentanalyse ausgeschlossen.

### 9.5.2.7 Datenprozessierung der LC-ESI-Q-IT-OT-MS/MS-Analyse

Die Daten der LC-MS/MS-Analyse der zweidimensionalen Gelelektrophorese (Abschnitt 9.4.2.6) wurden mit Proteome Discoverer 2.0 (Thermo Scientific, Bremen, Deutschland) ausgewertet. Für die Identifizierung wurden die Fragmentspektren mit der SequestHT-Suchmaschine gegen eine humane Datenbank (SwissProt, heruntergeladen am 10.11.2014, 20161 Einträge) und eine Kontaminanten-Datenbank (298 Einträge) gesucht. Die Parameter, die für die Identifizierung der Fragmentspektren verwendet wurden, sind in Tabelle 11



wiedergegeben. Für eine Proteinidentifizierung mussten mindestens zwei unterschiedliche und eindeutige (unique) Peptide pro Protein identifiziert worden sein.

Die Daten der LC-MS/MS-Analyse der eindimensionalen Gelelektrophorese (Abschnitt 9.4.2.5) wurden mit MaxQuant [145] (Version 1.5.2.8) prozessiert. Für die Identifizierung wurden die Fragmentspektren mit der Andromeda-Suchmaschine gegen eine humane Datenbank (SwissProt, heruntergeladen am 10.11.2014, 20161 Einträge) und eine Kontaminanten-Datenbank (298 Einträge) gesucht. Die Parameter, die für die Identifizierung der Fragmentspektren verwendet wurden, sind in Tabelle 11 wiedergegeben. Für eine Proteinidentifizierung mussten mindestens zwei unterschiedliche und eindeutige (unique) Peptide pro Protein identifiziert worden sein.

**Tabelle 11: Parameter für die Identifizierung der Fragmentspektren der nanoUPLC-ESI-Q-IT-OT-MS/MS-Analysen.**

Parameter	Einstellung
Enzym	Trypsin
Anzahl berücksichtigter verpasster Schnittstellen	2
Vorläuferionen-Massentoleranz	10 ppm
Fragmentionen-Massentoleranz	0,6 Da
berücksichtigte fixe Aminosäuremodifizierung	Carbamidomethylierung am Cystein
berücksichtigte variable Aminosäuremodifizierungen	Oxidation am Methionin, Acetylierung am Protein N-Terminus
Signifikanz-Grenzwert	p= 0,01

#### 9.5.2.7.1 Erstellung der Gelelektrophorese-Migrationsprofile

Für die identifizierten Proteine der Gelelektrophoresen des PIRL-DIVE-Homogenats und des konventionellen, mechanischen Homogenats wurden Gelelektrophorese-Migrationsprofile erstellt. Hierfür wurden die identifizierten Proteine mit dem MaxLFQ-Algorithmus quantifiziert [87]. Für die Quantifizierung wurden ausschließlich eindeutige Peptide verwendet und es mussten mindestens zwei eindeutige Peptide pro Protein vorhanden

gewesen sein. Für die Erstellung der Gelelektrophorese-Migrationsprofile wurden die Proteinintensitäten gegen die Banden der Gelelektrophorese aufgetragen.

#### **9.5.2.7.2 Bestimmung der relativen Proteolyse zwischen den Homogenaten der PIRL-Ablation und der mechanischen Homogenisierung**

Um die relative Proteolyse zwischen den Homogenaten der mechanischen Homogenisierung (MH) und der PIRL-Ablation (DH) zu bestimmen, wurden die Gelelektrophorese-Migrationsprofile der Proteine, die sowohl in MH als auch in DH identifiziert werden konnten, geglättet (Mathematica-Skript, Gauß-Filter: 2). Im Anschluss wurde für jedes Gelelektrophorese-Migrationsprofil die Position des Signals der abundantesten Proteinspezies des entsprechenden Gens bestimmt (Migrationssignal). Wenn die abundanteste Proteinspezies eines Gens sowohl im MH- als auch im DH-Gelelektrophorese-Migrationsprofil in der gleichen (Migrationssignalverschiebung= 0) oder in der benachbarten Bande (Migrationssignalverschiebung= -1, +1) detektiert wurde, betrug die Migrationsdistanz 0. Eine Migrationsdistanz von 0 bedeutete, dass für die abundanteste Proteinspezies eines Gens zwischen MH und DH keine Migrationsverschiebung zu niedrigeren Molekülmassen beobachtet wurde. Wenn die Migrationsdistanz für eine Proteinspezies zwischen MH und DH größer-gleich 2 war, wurde eine Migrationsverschiebung zu niedrigeren Molekülmassen beobachtet und es wurde angenommen, dass die Migrationsverschiebung durch einen proteolytischen Abbau während der Probenaufarbeitung zustande gekommen ist.

## 9.6 Materialien

### 9.6.1 Geräte

Gerät	Firma
ACQUITY UPLC PST C18 nanoACQUITY Column 10K psi, 130Å, 1.7 µm, 75 µm X 200 mm	Waters (Manchester, UK)
ACQUITY UPLC PST C18 nanoACQUITY Trap 10K psi MV, 100Å, 5 µm, 180 µm X 20 mm	Waters (Manchester, UK)
Acclaim PepMap 100	Thermo Scientific (Bremen, Deutschland)
Acclaim PepMap µ-precolumn	Thermo Scientific (Bremen, Deutschland)
Analysenwaage ALS 120-4	Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern, Deutschland)
Dionex UltiMate 3000 RSLCnano	Thermo Scientific (Bremen, Deutschland)
GELoader	Eppendorf 8Hamburg, Deutschland)
Kältefalle Jouan RCT90	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Kühlzentrifuge 4-16K	Sigma (Osterode, Deutschland)
Membranpumpe MZ 2C VARIO	VACUUBRAND GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland
nanoACQUITY UPLC System	Waters (Manchester, UK)
NanoDrop 1000 Spektralphotometer	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
New Objective SilicaTip™ Emitter	New Objective (Woburn, USA)
Orbitrap Fusion	Thermo Scientific (Bremen, Deutschland)
pH-Meter Ø72	Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)
Q-TOF Premier	Micromass/Waters (Manchester, UK)
Reflex IV MALDI	Bruker (Bremen, Deutschland)
Tischzentrifuge Eppendorf 5415 C	Eppendorf 8Hamburg, Deutschland)
Vakuumpumpe ValuPump VLP120	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Vakuumbzentrifuge Jouan RC1010	Thermo Scientific (Waltham, USA)

## 9.6.2 Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Firma</b>
2,5-Dihydroxyacetophenon	Bruker (Bremen, Deutschland)
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Bruker (Bremen, Deutschland)
2-Hydroxyethyldisulfid	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland
2D Quant-Kit	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland
Acetonitril (LiChrosolv®)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ameisensäure	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Glycolsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Harnstoff	Amersham (Freiburg, Deutschland)
Iodacetamid	Sigma-Aldrich (Taufheim, Deutschland)
Methanol (LiChrosolv®)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
MES Probenpuffer 4x	Bio-Rad (München, Deutschland)
Oligo™R3 Bulk Medium	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
ortho-Phosphorsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Reduzierungsreagenz 20x	Bio-Rad (München, Deutschland)
Salzsäure (37%)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Thioharnstoff	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Titansphere TiO <sub>2</sub> Bulk Medium	GL Sciences (Torrance, USA)
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tris	Bio-Rad (München, Deutschland)
Trypsin Resuspensionspuffer	Promega (Mannheim, Deutschland)
Wasser (LiChrosolv®)	Merck (Darmstadt, Deutschland)

### 9.6.3 Biomaterialien

Materialien	Firma
Alpha-S1/S2-Casein	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Angiotensin 1-10	Projektgruppe Peptidsynthese der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter-Michael Klötzel, Leitung Dr. Petra Henklein (Charite, Berlin, Deutschland)
Beta-Casein	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
humanes Blutplasma	freiwilliger Proband
humane Tonsillen	Patienten von Dr. Hannes Petersen (UKE, Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde)
murines Muskel- und Lebergewebe	PD Dr. Andrea Horst (UKE, Experimentelle Immunologie und Hepatologie, Hamburg, Deutschland)
RNase A	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Trypsin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

### 9.6.4 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Firma
Empore Extraktionsmembran C18, C8	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Fused-Silica-Kapillaren O.D. 360 µm, I.D. 75 µm	Postnova Analytics GmbH (Landsberg am Lech, Deutschland)
GeLoader Pipettenspitzen 10 µL	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Insulinspritze 1 mL	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Pipettenspitzen 10 µL, 200 µL, 1000 µL	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäß 15 mL, 50 mL	Greiner (Melsungen, Deutschland)

## 9.6.5 Software

Software	Firma
FlexAnalysis 3.3	Bruker (Bremen, Deutschland)
Graph Pad Prism 4	Graph Pad Software, Inc. (San Diego, USA)
Wolfram Mathematica 9.0.1.0	Wolfram Research (Oxfordshire, UK)
MassLynx 4.1	Waters (Manchester, UK)
massWolf	<a href="http://sourceforge.net/projects/sashimi/files/massWolf%20%28MassLynx%20converter%29/">http://sourceforge.net/projects/sashimi/files/massWolf%20%28MassLynx%20converter%29/</a>
MaxQuant 1.5.2.8	<a href="http://141.61.102.17/maxquant_doku/doku.php?id=maxquant:installation">http://141.61.102.17/maxquant_doku/doku.php?id=maxquant:installation</a>
OpenMS 1.11.1	AG Oliver Kohlbacher (Angewandte Bioinformatik Gruppe, Eberhard Karl Universität Tübingen, Deutschland), AG Knut Reinert (Algorithmische Bioinformatik, FU Berlin, Deutschland), <a href="http://open-ms.sourceforge.net/">http://open-ms.sourceforge.net/</a>
Proteome Discoverer 2.0	Thermo Scientific (Bremen, Deutschland)
ProteinLynx 2.5.2	Waters (Manchester, UK)

## 10 Literatur

- [1] Wilkins M. Proteomics data mining. Expert review of proteomics. 2009;6:599-603.
- [2] Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. Electrophoresis. 1995;16:1090-4.
- [3] Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. Bio/technology. 1996;14:61-5.
- [4] Jungblut P, Thiede B, Zimny-Arndt U, Muller EC, Scheler C, Wittmann-Liebold B, et al. Resolution power of two-dimensional electrophoresis and identification of proteins from gels. Electrophoresis. 1996;17:839-47.
- [5] Schlüter H, Apweiler R, Holzhutter HG, Jungblut PR. Finding one's way in proteomics: a protein species nomenclature. Chem Cent J. 2009;3:11.
- [6] Kelleher NL. A cell-based approach to the human proteome project. Journal of the American Society for Mass Spectrometry. 2012;23:1617-24.
- [7] Jungblut PR, Holzhutter HG, Apweiler R, Schluter H. The speciation of the proteome. Chem Cent J. 2008;2:16.
- [8] Jungblut PR. Back to the future--the value of single protein species investigations. Proteomics. 2013;13:3103-5.
- [9] Sirover MA. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochimica et biophysica acta. 1999;1432:159-84.
- [10] Chait BT. Chemistry. Mass spectrometry: bottom-up or top-down? Science. 2006;314:65-6.
- [11] Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek MC, Yates JR, 3rd. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. Chemical reviews. 2013;113:2343-94.
- [12] Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. Humangenetik. 1975;26:231-43.
- [13] O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. The Journal of biological chemistry. 1975;250:4007-21.
- [14] Meyer B, Papatotiriou DG, Karas M. 100% protein sequence coverage: a modern form of surrealism in proteomics. Amino acids. 2011;41:291-310.
- [15] Bodzon-Kulakowska A, Bierzynska-Krzysik A, Dylag T, Drabik A, Suder P, Noga M, et al. Methods for samples preparation in proteomic research. Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences. 2007;849:1-31.
- [16] Canas B, Pineiro C, Calvo E, Lopez-Ferrer D, Gallardo JM. Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. Journal of chromatography A. 2007;1153:235-58.
- [17] Stoll VS, Blanchard JS. Buffers: principles and practice. Methods in enzymology. 2009;463:43-56.
- [18] Valliere-Douglass JF, Connell-Crowley L, Jensen R, Schnier PD, Trilisky E, Leith M, et al. Photochemical degradation of citrate buffers leads to covalent acetonation of recombinant protein therapeutics. Protein science : a publication of the Protein Society. 2010;19:2152-63.
- [19] Hermanson GT. Bioconjugate Techniques. 2nd ed. Oxford: Elsevier Ltd; 2008.
- [20] Canova-Davis E, Eng M, Mukku V, Reifsnyder DH, Olson CV, Ling VT. Chemical heterogeneity as a result of hydroxylamine cleavage of a fusion protein of human insulin-like growth factor I. The Biochemical journal. 1992;285 ( Pt 1):207-13.

- [21] Milner SJ, Thomas SM, Ballard FJ, Francis GL. Optimization of the hydroxylamine cleavage of an expressed fusion protein to produce recombinant human insulin-like growth factor (IGF)-I. *Biotechnology and bioengineering*. 1996;50:265-72.
- [22] Fic E, Kedracka-Krok S, Jankowska U, Pirog A, Dziedzicka-Wasylewska M. Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis. *Electrophoresis*. 2010;31:3573-9.
- [23] Storrie B, Madden EA. Isolation of subcellular organelles. *Methods in enzymology*. 1990;182:203-25.
- [24] Ericsson C, Nister M. Protein extraction from solid tissue. *Methods Mol Biol*. 2011;675:307-12.
- [25] Ericsson C, Peredo I, Nister M. Optimized protein extraction from cryopreserved brain tissue samples. *Acta Oncol*. 2007;46:10-20.
- [26] Lee C. Protein extraction from mammalian tissues. *Methods Mol Biol*. 2007;362:385-9.
- [27] Sajic T, Hopfgartner G, Szanto I, Varesio E. Comparison of three detergent-free protein extraction protocols for white adipose tissue. *Analytical biochemistry*. 2011;415:215-7.
- [28] Scopes RK. *Protein Purification Principles and Practice* 3RD EDITION ed. New York: Springer-Verlag; 1994.
- [29] Svensson M, Boren M, Skold K, Falth M, Sjogren B, Andersson M, et al. Heat stabilization of the tissue proteome: a new technology for improved proteomics. *Journal of proteome research*. 2009;8:974-81.
- [30] Yi J, Kim C, Gelfand CA. Inhibition of intrinsic proteolytic activities moderates preanalytical variability and instability of human plasma. *Journal of proteome research*. 2007;6:1768-81.
- [31] Olivieri E, Herbert B, Righetti PG. The effect of protease inhibitors on the two-dimensional electrophoresis pattern of red blood cell membranes. *Electrophoresis*. 2001;22:560-5.
- [32] Ahmed MM, Gardiner KJ. Preserving protein profiles in tissue samples: differing outcomes with and without heat stabilization. *J Neurosci Methods*. 2011;196:99-106.
- [33] Stingl C, Soderquist M, Karlsson O, Boren M, Luider TM. Uncovering effects of ex vivo protease activity during proteomics and peptidomics sample extraction in rat brain tissue by oxygen-18 labeling. *Journal of proteome research*. 2014;13:2807-17.
- [34] Amini-Nik S, Kraemer D, Cowan ML, Gunaratne K, Nadesan P, Alman BA, et al. Ultrafast mid-IR laser scalpel: protein signals of the fundamental limits to minimally invasive surgery. *PLoS One*. 2010;5.
- [35] Jowett N, Wollmer W, Mlynarek AM, Wiseman P, Segal B, Franjic K, et al. Heat generation during ablation of porcine skin with erbium:YAG laser vs a novel picosecond infrared laser. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013;139:828-33.
- [36] Bottcher A, Kucher S, Knecht R, Jowett N, Krotz P, Reimer R, et al. Reduction of thermocoagulative injury via use of a picosecond infrared laser (PIRL) in laryngeal tissues. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2015;272:941-8.
- [37] Franjic K, Cowan ML, Kraemer D, Miller RJ. Laser selective cutting of biological tissues by impulsive heat deposition through ultrafast vibrational excitations. *Opt Express*. 2009;17:22937-59.
- [38] Franjic K, Miller D. Vibrationally excited ultrafast thermodynamic phase transitions at the water/air interface. *Phys Chem Chem Phys*. 2010;12:5225-39.
- [39] Cowan ML, Bruner BD, Huse N, Dwyer JR, Chugh B, Nibbering ET, et al. Ultrafast memory loss and energy redistribution in the hydrogen bond network of liquid H<sub>2</sub>O. *Nature*. 2005;434:199-202.
- [40] Miller RJ. Mapping atomic motions with ultrabright electrons: the chemists' gedanken experiment enters the lab frame. *Annu Rev Phys Chem*. 2014;65:583-604.



- [41] Kwiatkowski M, Wurlitzer M, Omid M, Ren L, Kruber S, Nimer R, et al. Ultrafast extraction of proteins from tissues using desorption by impulsive vibrational excitation. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2015;54:285-8.
- [42] Larsen MR, Thingholm TE, Jensen ON, Roepstorff P, Jorgensen TJ. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2005;4:873-86.
- [43] Hsieh HC, Sheu C, Shi FK, Li DT. Development of a titanium dioxide nanoparticle pipette-tip for the selective enrichment of phosphorylated peptides. *Journal of chromatography A*. 2007;1165:128-35.
- [44] Horst AK, Bickert T, Brewig N, Ludewig P, van Rooijen N, Schumacher U, et al. CEACAM1+ myeloid cells control angiogenesis in inflammation. *Blood*. 2009;113:6726-36.
- [45] McEntire KD, Mowery J, Hixson DC. Comparison of the structural characteristics of cell-CAM 105 from hepatocytes with those of an altered form expressed by rat transplantable hepatocellular carcinomas. *Cancer research*. 1989;49:6795-802.
- [46] Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8:221-33.
- [47] Cichon S, Martin L, Hennies HC, Muller F, Van Driessche K, Karpushova A, et al. Increased activity of coagulation factor XII (Hageman factor) causes hereditary angioedema type III. *American journal of human genetics*. 2006;79:1098-104.
- [48] Dewald G, Bork K. Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;343:1286-9.
- [49] Bjorkqvist J, de Maat S, Lewandrowski U, Di Gennaro A, Oschatz C, Schonig K, et al. Defective glycosylation of coagulation factor XII underlies hereditary angioedema type III. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125:3132-46.
- [50] Nesvizhskii AI. Proteogenomics: concepts, applications and computational strategies. *Nature methods*. 2014;11:1114-25.
- [51] Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, Moghaddas Gholami A, Lieberenz M, Savitski MM, et al. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature*. 2014;509:582-7.
- [52] Kim MS, Pinto SM, Getnet D, Nirujogi RS, Manda SS, Chaerkady R, et al. A draft map of the human proteome. *Nature*. 2014;509:575-81.
- [53] Catherman AD, Skinner OS, Kelleher NL. Top Down proteomics: facts and perspectives. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;445:683-93.
- [54] Zhang H, Ge Y. Comprehensive analysis of protein modifications by top-down mass spectrometry. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4:711.
- [55] Hefetz Y, Dunn DA, Deutsch TF, Buckley L, Hillenkamp F, Kochevar IE. Laser photochemistry of DNA: two-photon absorption and optical breakdown using high-intensity, 532-nm radiation. *J Am Chem Soc*. 1990;112:8528-32.
- [56] Paltauf G, Dyer PE. Photomechanical processes and effects in ablation. *Chemical reviews*. 2003;103:487-518.
- [57] Srinivasan R. Ablation of polymers and biological tissue by ultraviolet lasers. *Science*. 1986;234:559-65.
- [58] Hüttmann G, Birngruber R. On the Possibility of High-Precision Photothermal Microeffects and the Measurement of Fast Thermal Denaturation of Proteins. *EEE JOURNAL OF SELECTED TOPICS IN QUANTUM ELECTRONICS*,. 1999;5.
- [59] Hüttmann G, Radt B, Serbin J, Birngruber R. Inactivation of proteins by irradiation of gold nanoparticles with nano- and picosecond laser pulses. In: Steiner RW, editor. *European*

Conference on Biomedical Optics 2003. München, Deutschland: SPIE-OSA Biomedical Optics; 2003.

[60] Steel BC, McKenzie DR, Bilek MMM, Nosworthy NJ, dos Remedios CG. Nanosecond Responses of Proteins to Ultra-High Temperature Pulses. *Biophysical Journal: Biophysical Letters*. 2006;66-8.

[61] Holcapek M, Jirasko R, Lisa M. Basic rules for the interpretation of atmospheric pressure ionization mass spectra of small molecules. *Journal of chromatography A*. 2010;1217:3908-21.

[62] Guilhaus M. Principles and Instrumentation in Time-of-flight Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 1995;30.

[63] Gross JH. *Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch*: Springer Spektrum; 2013.

[64] Bodnar WM, Blackburn RK, Krise JM, Moseley MA. Exploiting the complementary nature of LC/MALDI/MS/MS and LC/ESI/MS/MS for increased proteome coverage. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2003;14:971-9.

[65] Stapels MD, Barofsky DF. Complementary use of MALDI and ESI for the HPLC-MS/MS analysis of DNA-binding proteins. *Analytical chemistry*. 2004;76:5423-30.

[66] Kumar A, Bachawat AK. Pyroglutamic acid: throwing light on a lightly studied metabolite *Current Science*. 2012;102.

[67] Schilling S, Hoffmann T, Manhart S, Hoffmann M, Demuth HU. Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS letters*. 2004;563:191-6.

[68] Baglioni C. The role of pyrrolidone carboxylic acid in the initiation of immunoglobulin peptide chains. *Biochemical and biophysical research communications*. 1970;38:212-9.

[69] Rehder DS, Dillon TM, Pipes GD, Bondarenko PV. Reversed-phase liquid chromatography/mass spectrometry analysis of reduced monoclonal antibodies in pharmaceuticals. *Journal of chromatography A*. 2006;1102:164-75.

[70] Sanger F, Thompson EO, Kitai R. The amide groups of insulin. *The Biochemical journal*. 1955;59:509-18.

[71] Krokhin OV, Antonovici M, Ens W, Wilkins JA, Standing KG. Deamidation of -Asn-Gly-sequences during sample preparation for proteomics: Consequences for MALDI and HPLC-MALDI analysis. *Analytical chemistry*. 2006;78:6645-50.

[72] Du Y, Wang F, May K, Xu W, Liu H. Determination of deamidation artifacts introduced by sample preparation using <sup>18</sup>O-labeling and tandem mass spectrometry analysis. *Analytical chemistry*. 2012;84:6355-60.

[73] Capasso S, Mazzarella L, Sica F, Zagari A. Deamidation via cyclic imide in asparaginyll peptides. *Peptide research*. 1989;2:195-200.

[74] Joshi AB, Kirsch LE. The relative rates of glutamine and asparagine deamidation in glucagon fragment 22-29 under acidic conditions. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2002;91:2331-45.

[75] Walsh G, Murphy B. *Biopharmaceuticals, an Industrial Perspective*. 1999th Edition ed: Springer; 1999.

[76] Li X, Cournoyer JJ, Lin C, O'Connor PB. Use of <sup>18</sup>O labels to monitor deamidation during protein and peptide sample processing. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2008;19:855-64.

[77] Capelo JL, Carreira RJ, Fernandes L, Lodeiro C, Santos HM, Simal-Gandara J. Latest developments in sample treatment for <sup>18</sup>O-isotopic labeling for proteomics mass spectrometry-based approaches: a critical review. *Talanta*. 2010;80:1476-86.

- [78] Guan Z, Yates NA, Bakhtiar R. Detection and characterization of methionine oxidation in peptides by collision-induced dissociation and electron capture dissociation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2003;14:605-13.
- [79] Lagerwerf FM, van de Weert M, Heerma W, Haverkamp J. Identification of oxidized methionine in peptides. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*. 1996;10:1905-10.
- [80] Levine RL, Moskovitz J, Stadtman ER. Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB life*. 2000;50:301-7.
- [81] Lundblad RL. *Chemical Reagents for Protein Modification*. 4th ed: Crc Pr Inc; 2014.
- [82] Pesavento JJ, Garcia BA, Streeky JA, Kelleher NL, Mizzen CA. Mild performic acid oxidation enhances chromatographic and top down mass spectrometric analyses of histones. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2007;6:1510-26.
- [83] Schey KL, Finley EL. Identification of peptide oxidation by tandem mass spectrometry. *Accounts of chemical research*. 2000;33:299-306.
- [84] Liebler DC, Zimmerman LJ. Targeted quantitation of proteins by mass spectrometry. *Biochemistry*. 2013;52:3797-806.
- [85] Kohlbacher O, Reinert K, Gropl C, Lange E, Pfeifer N, Schulz-Trieglaff O, et al. TOPP--the OpenMS proteomics pipeline. *Bioinformatics*. 2007;23:e191-7.
- [86] Sturm M, Bertsch A, Gropl C, Hildebrandt A, Hussong R, Lange E, et al. OpenMS - an open-source software framework for mass spectrometry. *BMC bioinformatics*. 2008;9:163.
- [87] Cox J, Hein MY, Lubner CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2014;13:2513-26.
- [88] Gorshkov V, Verano-Braga T, Kjeldsen F. SuperQuant: A Data Processing Approach to Increase Quantitative Proteome Coverage. *Analytical chemistry*. 2015;87:6319-27.
- [89] Li XJ, Zhang H, Ranish JA, Aebersold R. Automated statistical analysis of protein abundance ratios from data generated by stable-isotope dilution and tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry*. 2003;75:6648-57.
- [90] Mo F, Mo Q, Chen Y, Goodlett DR, Hood L, Omenn GS, et al. WaveletQuant, an improved quantification software based on wavelet signal threshold de-noising for labeled quantitative proteomic analysis. *BMC bioinformatics*. 2010;11:219.
- [91] Nasso S, Hartler J, Trajanoski Z, Di Camillo B, Mechtler K, Toffolo GM. 3DSpectra: A 3-dimensional quantification algorithm for LC-MS labeled profile data. *Journal of proteomics*. 2015;112:156-65.
- [92] Silva JC, Denny R, Dorschel CA, Gorenstein M, Kass IJ, Li GZ, et al. Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. *Analytical chemistry*. 2005;77:2187-200.
- [93] Nilse L, Sturm M, Trudgian D, Salek M, Sims PFG, Carroll KM, et al. SILACAnalyzer - A Tool for Differential Quantitation of Stable Isotope Derived Data. *Computational Intelligence Methods for Bioinformatics and Biostatistics*. 2010;6160.
- [94] Bischoff R, Schluter H. Amino acids: chemistry, functionality and selected non-enzymatic post-translational modifications. *Journal of proteomics*. 2012;75:2275-96.
- [95] Karve TM, Cheema AK. Small changes huge impact: the role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease. *Journal of amino acids*. 2011;2011:207691.
- [96] Wang YC, Peterson SE, Loring JF. Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. *Cell research*. 2014;24:143-60.
- [97] Johnson LN. The regulation of protein phosphorylation. *Biochemical Society transactions*. 2009;37:627-41.

- [98] Landry CR, Freschi L, Zarin T, Moses AM. Turnover of protein phosphorylation evolving under stabilizing selection. *Frontiers in genetics*. 2014;5:245.
- [99] Tarrant MK, Cole PA. The chemical biology of protein phosphorylation. *Annual review of biochemistry*. 2009;78:797-825.
- [100] Ubersax JA, Ferrell JE, Jr. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8:530-41.
- [101] Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002;298:1912-34.
- [102] Boersema PJ, Mohammed S, Heck AJ. Phosphopeptide fragmentation and analysis by mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry : JMS*. 2009;44:861-78.
- [103] Wollscheid B, Bausch-Fluck D, Henderson C, O'Brien R, Bibel M, Schiess R, et al. Mass-spectrometric identification and relative quantification of N-linked cell surface glycoproteins. *Nature biotechnology*. 2009;27:378-86.
- [104] Tan K, Zelus BD, Meijers R, Liu JH, Bergelson JM, Duke N, et al. Crystal structure of murine sCEACAM1a[1,4]: a coronavirus receptor in the CEA family. *The EMBO journal*. 2002;21:2076-86.
- [105] Ghesquiere B, Van Damme J, Martens L, Vandekerckhove J, Gevaert K. Proteome-wide characterization of N-glycosylation events by diagonal chromatography. *Journal of proteome research*. 2006;5:2438-47.
- [106] Lee HJ, Larue JN, Wilson IB. Human plasma converting enzyme. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1971;142:548-51.
- [107] Lanzillo JJ, Fanburg BL. Angiotensin I converting enzyme from human plasma. *Biochemistry*. 1977;16:5491-5.
- [108] Hildebrand D, Merkel P, Eggers LF, Schluter H. Proteolytic processing of angiotensin-I in human blood plasma. *PLoS One*. 2013;8:e64027.
- [109] Feist P, Hummon AB. Proteomic challenges: sample preparation techniques for microgram-quantity protein analysis from biological samples. *International journal of molecular sciences*. 2015;16:3537-63.
- [110] Wisniewski JR. Proteomic sample preparation from formalin fixed and paraffin embedded tissue. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2013.
- [111] Bian Y, Song C, Cheng K, Dong M, Wang F, Huang J, et al. An enzyme assisted RP-RPLC approach for in-depth analysis of human liver phosphoproteome. *Journal of proteomics*. 2014;96:253-62.
- [112] Dephoure N, Zhou C, Villen J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, Elledge SJ, et al. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:10762-7.
- [113] Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, et al. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*. 2006;127:635-48.
- [114] Olsen JV, Vermeulen M, Santamaria A, Kumar C, Miller ML, Jensen LJ, et al. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Science signaling*. 2010;3:ra3.
- [115] Rigbolt KT, Prokhorova TA, Akimov V, Henningsen J, Johansen PT, Kratchmarova I, et al. System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation. *Science signaling*. 2011;4:rs3.
- [116] Rush J, Moritz A, Lee KA, Guo A, Goss VL, Spek EJ, et al. Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nature biotechnology*. 2005;23:94-101.
- [117] Seo J, Jeong J, Kim YM, Hwang N, Paek E, Lee KJ. Strategy for comprehensive identification of post-translational modifications in cellular proteins, including low abundant

modifications: application to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Journal of proteome research*. 2008;7:587-602.

[118] Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*. 2009;325:834-40.

[119] Dziadek M, Kazenwadel JS, Hendrey JA, Pan TC, Zhang RZ, Chu ML. Alternative splicing of transcripts for the alpha 3 chain of mouse collagen VI: identification of an abundant isoform lacking domains N7-N10 in mouse and human. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2002;21:227-41.

[120] Bonaldo P, Russo V, Bucciotti F, Doliana R, Colombatti A. Structural and functional features of the alpha 3 chain indicate a bridging role for chicken collagen VI in connective tissues. *Biochemistry*. 1990;29:1245-54.

[121] Colombatti A, Bonaldo P. Biosynthesis of chick type VI collagen. II. Processing and secretion in fibroblasts and smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*. 1987;262:14461-6.

[122] Colombatti A, Bonaldo P, Ainger K, Bressan GM, Volpin D. Biosynthesis of chick type VI collagen. I. Intracellular assembly and molecular structure. *The Journal of biological chemistry*. 1987;262:14454-60.

[123] Engvall E, Hessel H, Klier G. Molecular assembly, secretion, and matrix deposition of type VI collagen. *The Journal of cell biology*. 1986;102:703-10.

[124] Trueb B, Winterhalter KH. Type VI collagen is composed of a 200 kd subunit and two 140 kd subunits. *The EMBO journal*. 1986;5:2815-9.

[125] Doliana R, Bonaldo P, Colombatti A. Multiple forms of chicken alpha 3(VI) collagen chain generated by alternative splicing in type A repeated domains. *The Journal of cell biology*. 1990;111:2197-205.

[126] Stokes DG, Saitta B, Timpl R, Chu ML. Human alpha 3(VI) collagen gene. Characterization of exons coding for the amino-terminal globular domain and alternative splicing in normal and tumor cells. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266:8626-33.

[127] Zanussi S, Doliana R, Segat D, Bonaldo P, Colombatti A. The human type VI collagen gene. mRNA and protein variants of the alpha 3 chain generated by alternative splicing of an additional 5-end exon. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267:24082-9.

[128] Laurent GJ. Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass. *The American journal of physiology*. 1987;252:C1-9.

[129] Anderson NL. The clinical plasma proteome: a survey of clinical assays for proteins in plasma and serum. *Clin Chem*. 2010;56:177-85.

[130] Fuzery AK, Levin J, Chan MM, Chan DW. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges. *Clinical proteomics*. 2013;10:13.

[131] Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 2004;304:554.














[132] Moore SM, Rintoul RC, Walker TR, Chilvers ER, Haslett C, Sethi T. The presence of a constitutively active phosphoinositide 3-kinase in small cell lung cancer cells mediates anchorage-independent proliferation via a protein kinase B and p70s6k-dependent pathway. *Cancer research*. 1998;58:5239-47.
















[133] Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, Collins C, et al. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nature genetics*. 1999;21:99-102.

- [134] Baker AF, Dragovich T, Ihle NT, Williams R, Fenoglio-Preiser C, Powis G. Stability of phosphoprotein as a biological marker of tumor signaling. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11:4338-40.
- [135] Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science*. 1997;275:665-8.
- [136] Lin J, Adam RM, Santiestevan E, Freeman MR. The phosphatidylinositol 3'-kinase pathway is a dominant growth factor-activated cell survival pathway in LNCaP human prostate carcinoma cells. *Cancer research*. 1999;59:2891-7.
- [137] Xu G, Zhang W, Bertram P, Zheng XF, McLeod H. Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-AKT-mTOR pathway in common human tumors. *International journal of oncology*. 2004;24:893-900.
- [138] Culig Z. Distinguishing indolent from aggressive prostate cancer. Recent results in cancer research *Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer*. 2014;202:141-7.
- [139] Kreisberg JI, Malik SN, Prihoda TJ, Bedolla RG, Troyer DA, Kreisberg S, et al. Phosphorylation of Akt (Ser473) is an excellent predictor of poor clinical outcome in prostate cancer. *Cancer research*. 2004;64:5232-6.
- [140] Ebhardt HA, Root A, Sander C, Aebersold R. Applications of targeted proteomics in systems biology and translational medicine. *Proteomics*. 2015;15:3193-208.
- [141] Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature methods*. 2009;6:359-62.
- [142] Mulisch M, Welsch U. *Romeis Mikroskopische Technik*. 18th ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010.
- [143] Klose J, Kobalz U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*. 1995;16:1034-59.
- [144] Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols*. 2006;1:2856-60.
- [145] Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology*. 2008;26:1367-72.

## 11 Anhang

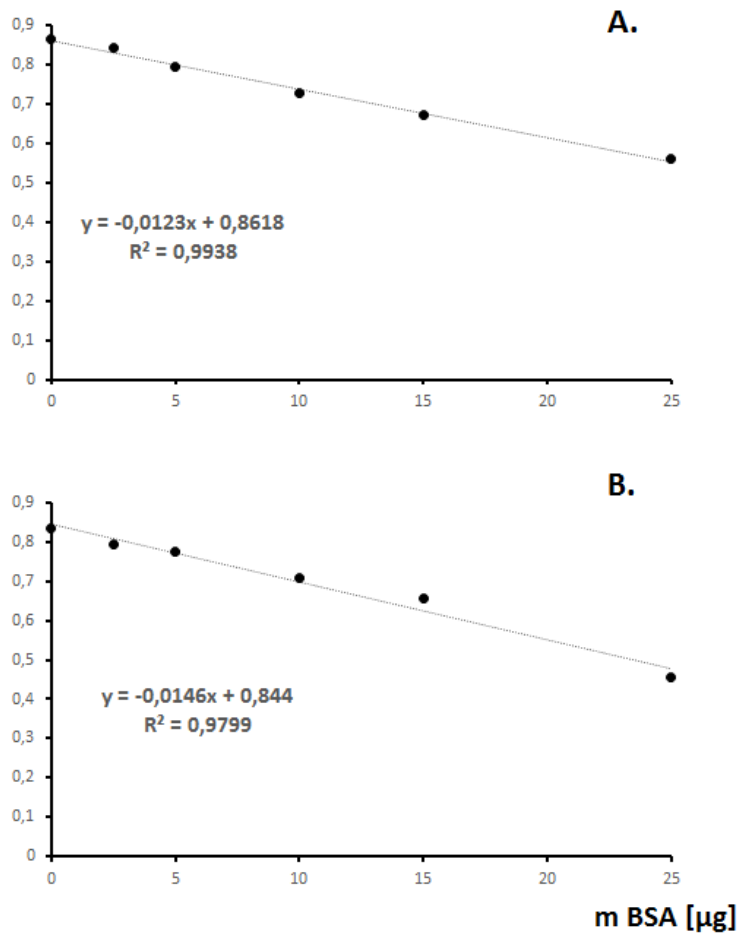
### 11.1 Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS

Chemikalie	GHS Symbol	P-Sätze	H-Sätze
2,5-Dihydroxyacetophenon		261- 305+351+338	315-319-335
2,5-Dihydroxybenzoesäure		261- 305+351+338	302-315-319- 335
2D Quant-Kit Kupferlösung		273-280- 302+352- 305+351+338	301-302-314- 315-318-319- 400-410-411- 412
2D Quant-Kit Ausfällungsmittel		273-280- 303+361+353- 305+351+338	314-318-335- 400-410-411
2-Hydroxyethyldisulfid		264-270- 301+310-330- 405-501	301
Acetonitril		210- 305+351+338- 403+235	225-332-302- 312-319
Ameisensäure		260-280- 301+330+331- 305+351+338- 308+310	226-314
Ammoniumhydrogencarbonat			302
Dithiothreitol		302+352- 305+351+338	302-315-319
Glycolsäure		280- 305+351+338- 310	302-314
Iodacetamid		261-280- 301+310- 342+311	301-317-334- 413
MES Probenpuffer 4x		280-264- 305+351+338- 310-405-501	319
Methanol		210-233-280- 302+352	225-331-311- 301-370

Oligo™R3 Bulk Medium		261-304+340- 312-403+233- 405	335
ortho-Phosphorsäure		280- 301+330+331- 305+351+338- 309+310	304-290
Reduzierungsreagenz 20x		260- 303+361+353- 305+351+338- 310-405-501	319
Salzsäure (37%)	 	234-260- 304+340- 303+361+353- 305+351+338- 309+311-501	290-314-335
Stickstoff, flüssig		282-336+315- 403	281
Thioharnstoff	  	273-281- 308+313	351-361d-302- 411
TiO <sub>2</sub> Bulk Medium		260-264-280- 310- 301+330+331- 303+361+353- 363-304+340- 305+351+338- 405-501	314-318
Trifluoressigsäure	 	271-273- 301+330+331- 305+351+338- 309+310	332-314-412
Tris		261- 305+351+338	315-319-335
Trypsin	 	285-261- 305+351+338- 321-405-501	319-335-315- 334

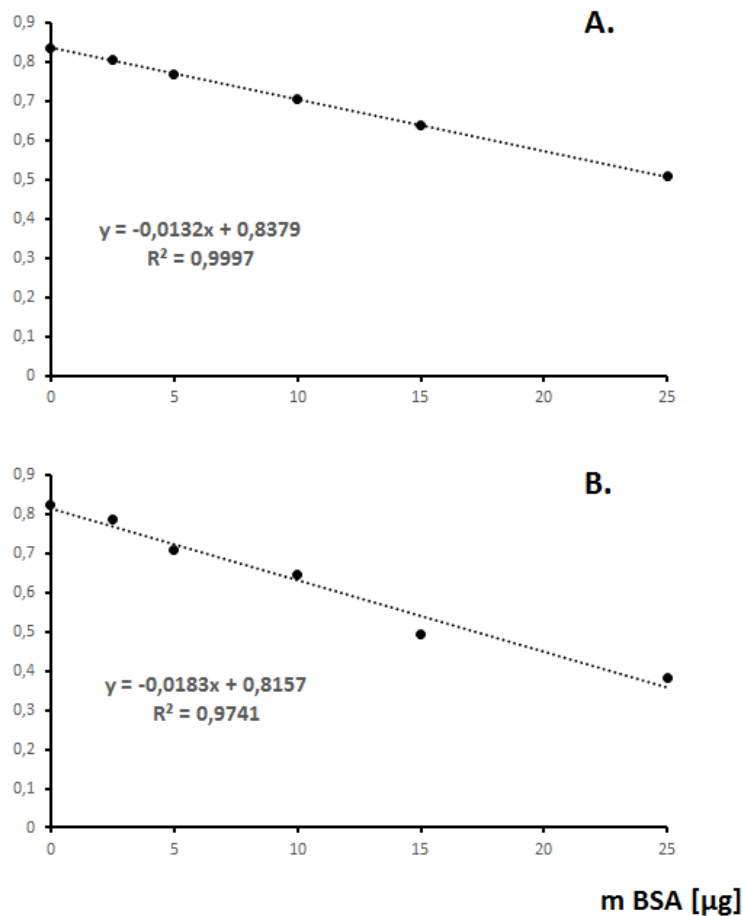


## 11.2 Abbildungen

UV-Absorption  
bei 480 nm [a.u.]

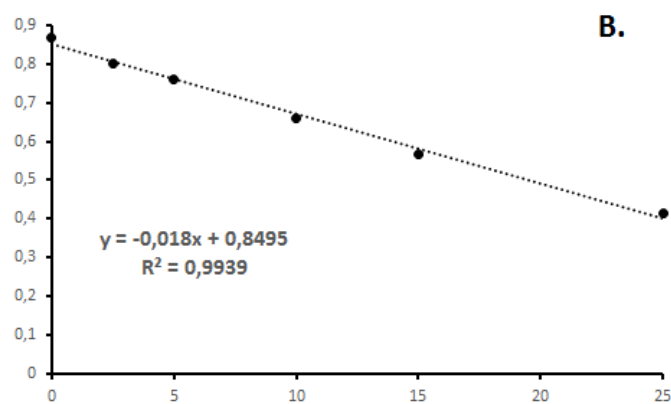
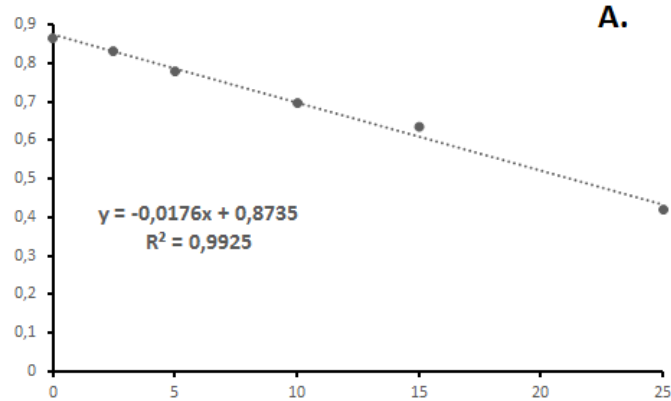
**Abbildung 43: BSA-Kalibriergerade zur Proteinbestimmung der Proteinextrakte der humanen Tonsille Nr. 1. A.:** BSA-Kalibriergerade für die Proteinbestimmung des Proteinextrakts der mechanischen Homogenisierung. Die UV Absorption des Proteinextrakts bei 480 nm betrug 0,677. Die Proteinkonzentration des mechanischen Proteinextrakts betrug entsprechend der Geradengleichung  $c = 6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . B.: BSA-Kalibriergerade für die Proteinbestimmung des Proteinextrakts der PIRL-DIVE-Homogenisierung. Die UV Absorption des Proteinextrakts bei 480 nm betrug 0,725. Die Proteinkonzentration des Proteinextrakts der PIRL-DIVE-Homogenisierung betrug entsprechend der Geradengleichung  $c = 3,3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Punkte: die gemessene UV Absorption bei 480 nm. gestrichelte Linie: Ausgleichsgerade der linearen Regression. Ordinate: UV Absorption [a.u.]. Abszisse: BSA-Menge [µg].

**UV-Absorption  
bei 480 nm [a.u.]**



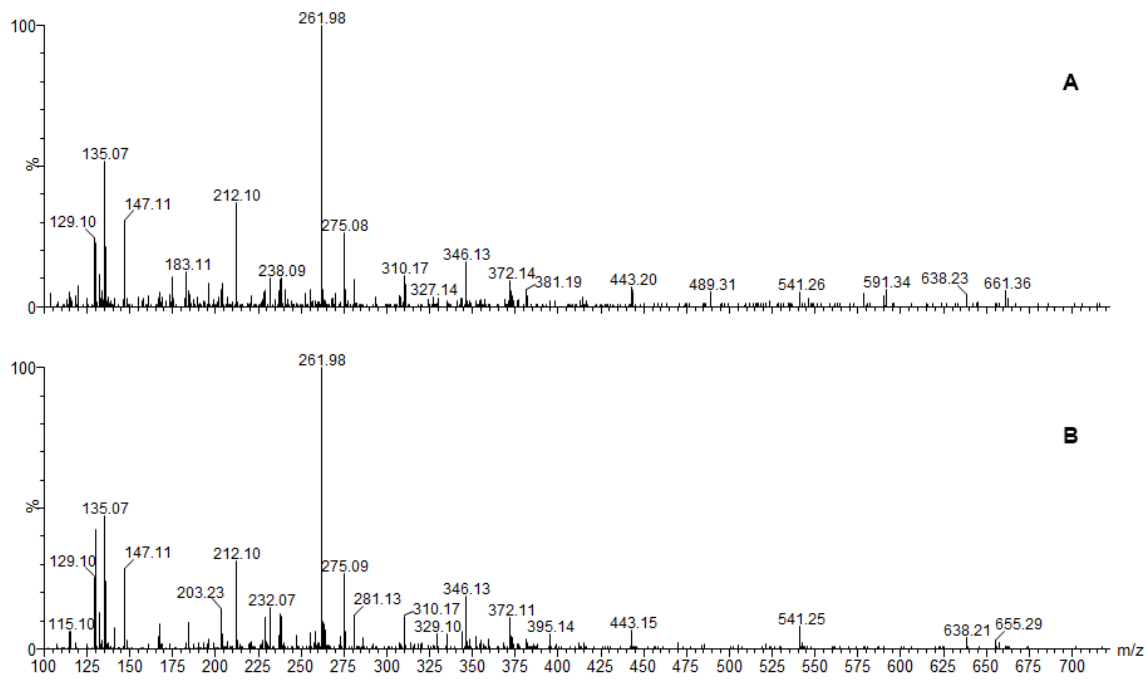
**Abbildung 44: BSA-Kalibriergerade zur Proteinbestimmung der Proteinextrakte der humanen Tonsille Nr. 2. A.:** BSA-Kalibriergerade für die Proteinbestimmung des Proteinextrakts der mechanischen Homogenisierung. Die UV Absorption des Proteinextrakts bei 480 nm betrug 0,668. Die Proteinkonzentration des mechanischen Proteinextrakts betrug entsprechend der Geradengleichung  $c = 5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . B.: BSA-Kalibriergerade für die Proteinbestimmung des Proteinextrakts der PIRL-DIVE-Homogenisierung. Die UV Absorption des Proteinextrakts bei 480 nm betrug 0,703. Die Proteinkonzentration des Proteinextrakts der PIRL-DIVE-Homogenisierung betrug entsprechend der Geradengleichung  $c = 2,3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Punkte: die gemessene UV Absorption bei 480 nm. gestrichelte Linie: Ausgleichsgerade der linearen Regression. Ordinate: UV Absorption [a.u.]. Abszisse: BSA-Menge [µg].

**UV-Absorption  
bei 480 nm [a.u.]**

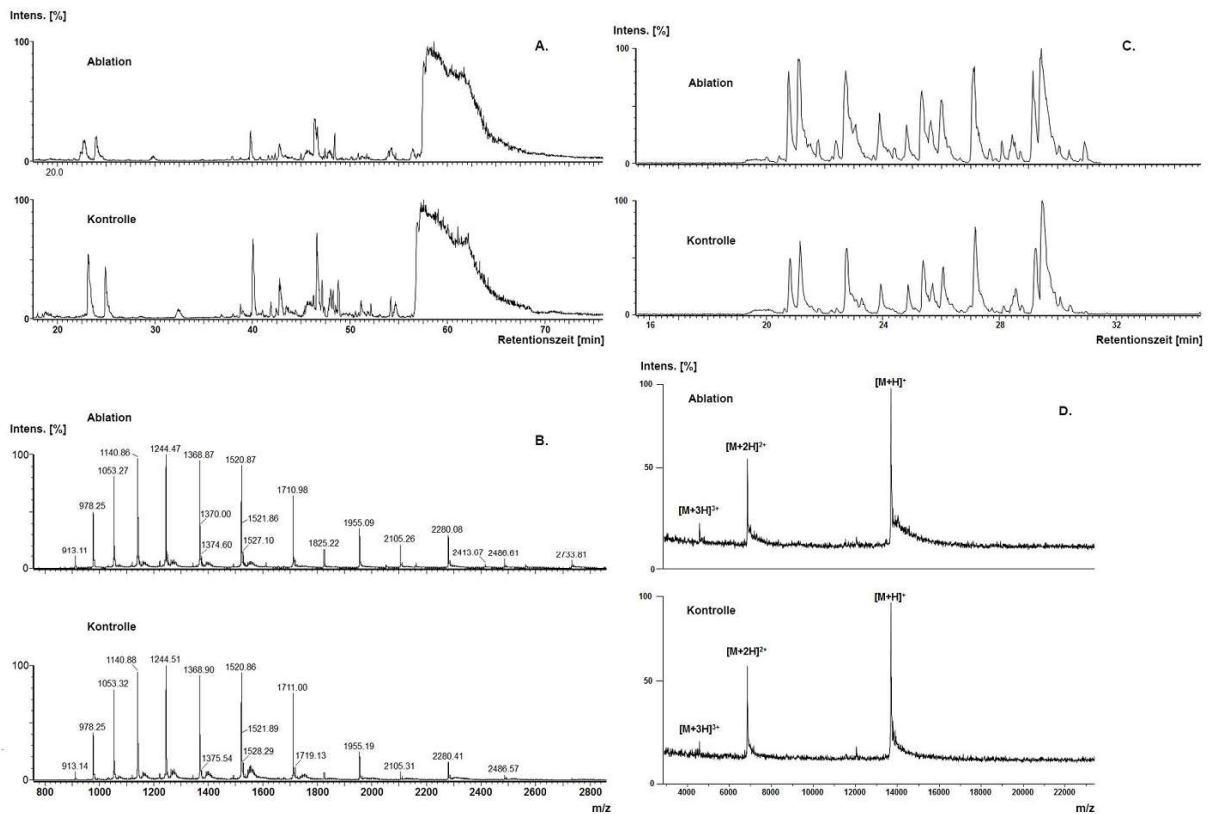


**m BSA [µg]**

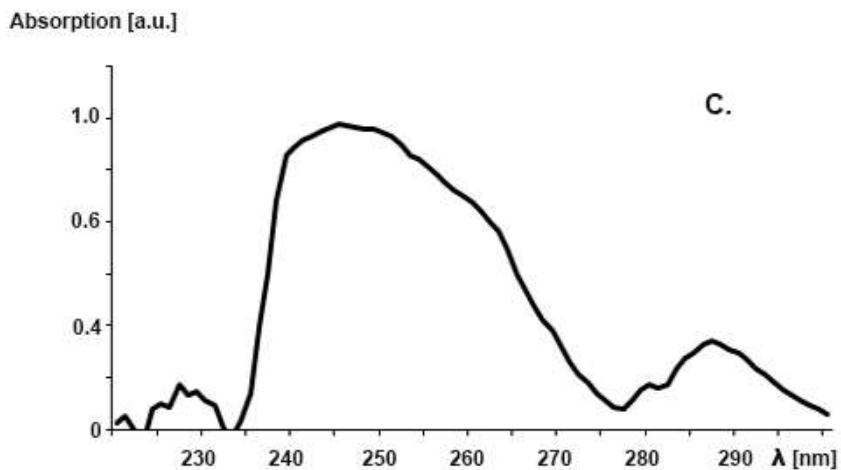
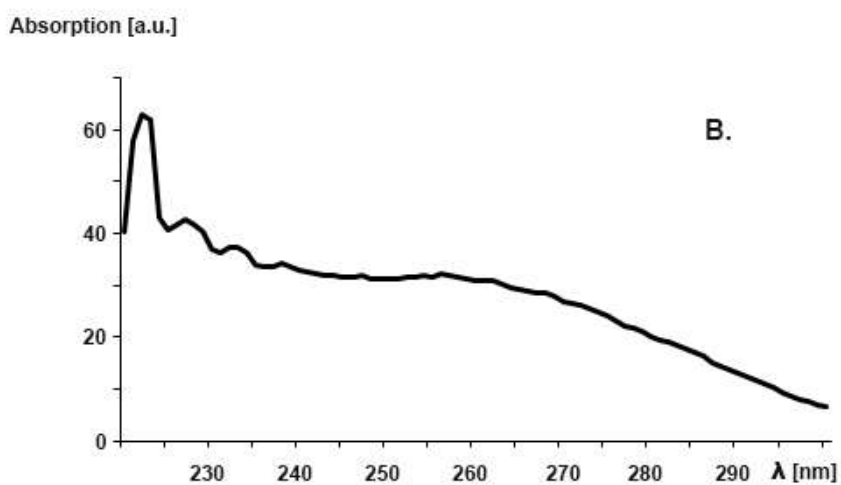
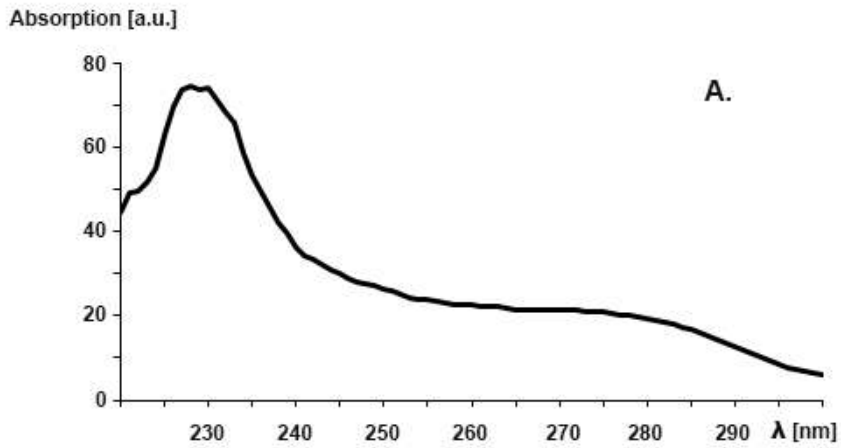
**Abbildung 45: BSA-Kalibriergerade zur Proteinbestimmung der Proteinextrakte der humanen Tonsille Nr. 3. A.:** BSA-Kalibriergerade für die Proteinbestimmung des Proteinextrakts der mechanischen Homogenisierung. Die UV Absorption des Proteinextrakts bei 480 nm betrug 0,54. Die Proteinkonzentration des mechanischen Proteinextrakts betrug entsprechend der Geradengleichung  $c = 7,6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . B.: BSA-Kalibriergerade für die Proteinbestimmung des Proteinextrakts der PIRL-DIVE-Homogenisierung. Die UV Absorption des Proteinextrakts bei 480 nm betrug 0,769. Die Proteinkonzentration des Proteinextrakts der PIRL-DIVE-Homogenisierung betrug entsprechend der Geradengleichung  $c = 1,6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Punkte: die gemessene UV Absorption bei 480 nm. gestrichelte Linie: Ausgleichsgerade der linearen Regression. Ordinate: UV Absorption [a.u.]. Abszisse: BSA-Menge [µg].



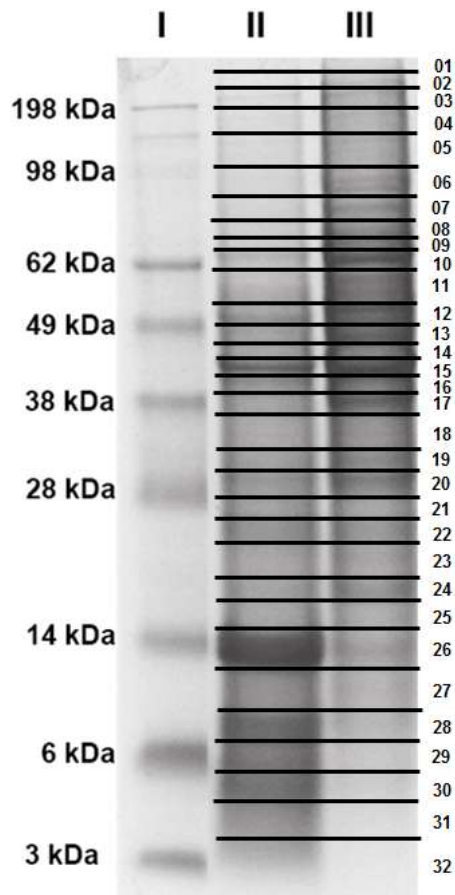
**Abbildung 46: Fragmentspektren des Vorläuferions  $m/z$  521,15  $[M+2H]^{2+}$  (Abbildung 3) in der LC-MS/MS-Analyse der tryptischen RNase A-Peptide zur RT 23,02 min. A: Fragmentspektrum des Vorläuferions  $m/z$  521,15  $[M+2H]^{2+}$  in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A nach PIRL-Ablation. B: Fragmentspektrum des Vorläuferions  $m/z$  521,15  $[M+2H]^{2+}$  in der LC-MS/MS-Analyse der RNase A vor PIRL-Ablation. Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ).**



**Abbildung 47: Analyse der chemischen Zusammensetzung der RNase A (2. Charge) vor (Kontrolle) und nach (Ablation) PIRL-Ablation.** A: Basis-Peak-Chromatogramme der LC-MS-Analysen der intakten RNase A vor und nach PIRL-Ablation. B: MS-Summenspektrum der LC-MS-Analyse der intakten RNase A vor und nach PIRL-Ablation, RT: 57 min bis 62 min. C: Basis-Peak-Chromatogramme der LC-MS/MS-Analysen der tryptischen RNase A-Peptide vor und nach PIRL-Ablation. D: MALDI-MS-Spektren der intakten RNase A vor und nach PIRL-Ablation. Matrix: 2,5-Dihydroxyacetophenon (DHAP). Ablation:  $[M+H]^+$ , m/z 13684;  $[M+2H]^{2+}$ , m/z 6841,4;  $[M+3H]^{3+}$ , m/z 4563,2. Kontrolle:  $[M+H]^+$ , m/z 13684,1;  $[M+2H]^{2+}$ , m/z 6842,2;  $[M+3H]^{3+}$ , m/z 4564,2. Ordinate: Intensität [%]. Abszisse: Masse-zu-Ladungsverhältnis [m/z].

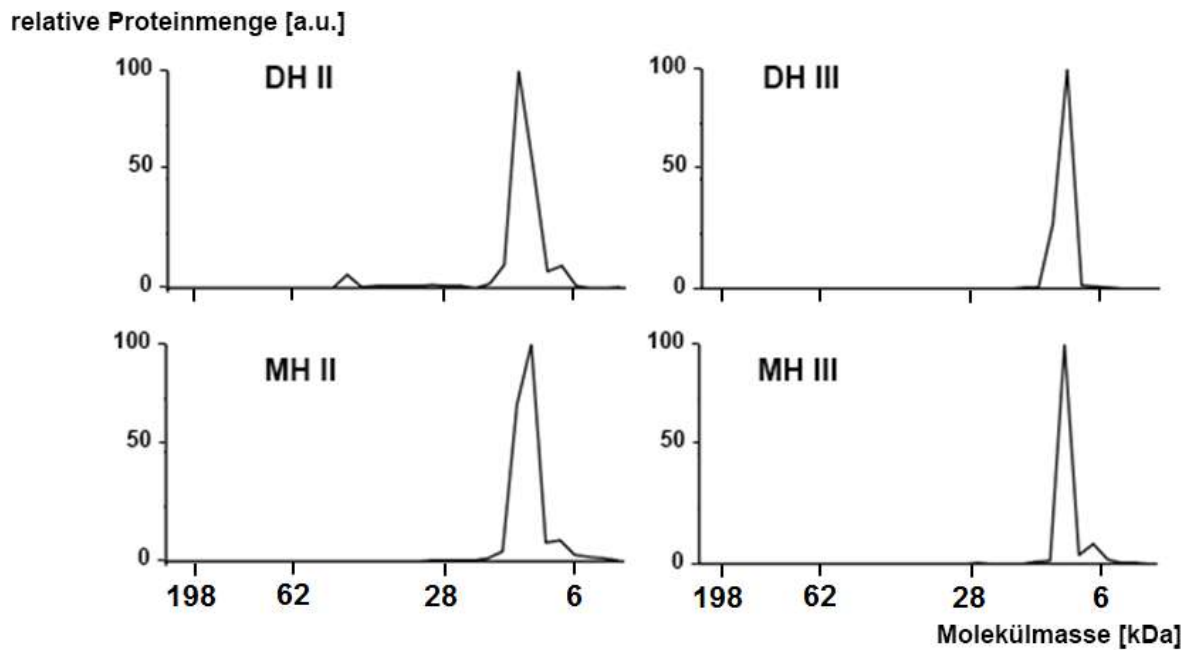


**Abbildung 48: UV-Absorptionsspektren.** A. UV-Absorptionsspektrum der Proteinbestimmung des Kondensats der PIRL-DIVE-Ablation des Mausmuskelgewebes. Verhältnis 260 nm/280 nm: 1,16. UV-Absorption 280 nm: 19,326. B: UV-Absorptionsspektrum der Proteinbestimmung des Kondensats der PIRL-DIVE-Ablation des Mausebergewebes. Verhältnis 260 nm/280 nm: 1,54. UV-Absorption 280 nm: 20,104. C: UV-Absorptionsspektrum der Proteinbestimmung der konventionellen Proteinextraktion des Mausmuskelgewebes. Verhältnis 260 nm/280 nm: 4,98. UV-Absorption 280 nm: 0,175.



**Abbildung 49: SDS-PAGE der Proteinextrakte der humanen Tonsille Nr. 1 nach konventioneller, mechanischer Homogenisierung (II.) und PIRL-DIVE-Homogenisierung (III.).** A: I: Proteinstandard. II: Proteinextrakt des konventionellen, mechanischen Homogenats (MH,  $m=40\ \mu\text{g}$ ). III: Proteinextrakt des PIRL-DIVE-Homogenats (DH,  $m=40\ \mu\text{g}$ ). Die eingezeichneten Linien und Ziffern markieren die Banden, die für die LC-MS/MS-Analyse ausgeschnitten und tryptisch verdaut wurden. Die Bahnen der SDS-PAGE der humanen Tonsille Nr. 2 und Nr. 3 wurden für den tryptischen In-Gel-Verdau und die LC-MS/MS-Analyse entsprechend der obigen Abbildungen in miteinander vergleichbare Banden unterteilt.

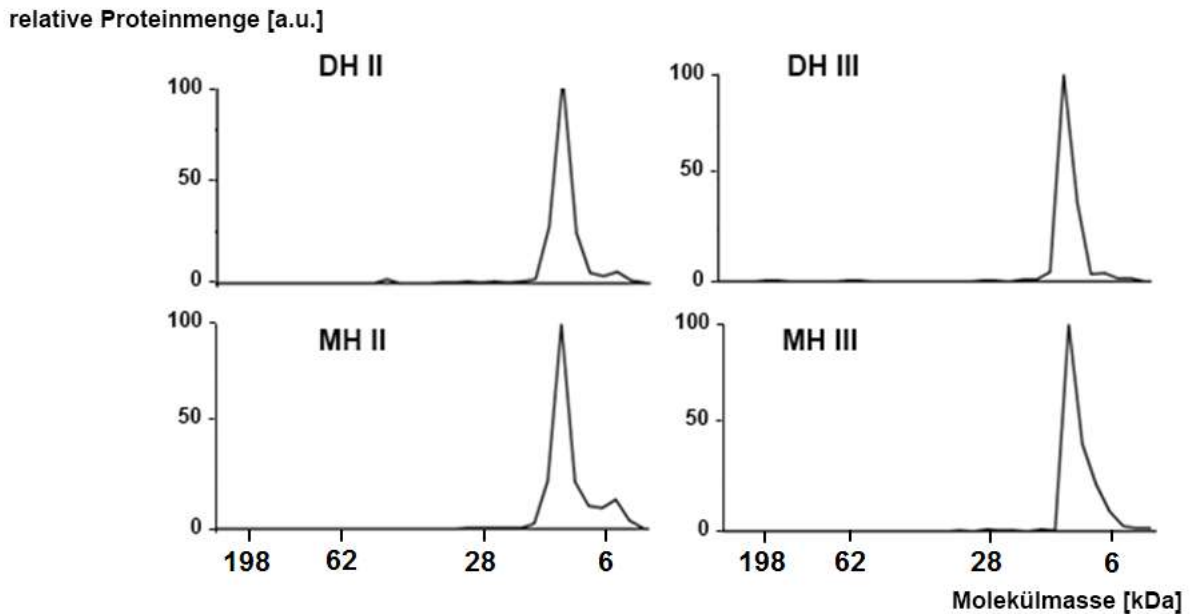
## Hämoglobin Untereinheit Alpha



**Abbildung 50: Gelelektrophorese-Migrationsprofile für Proteinspezies unterschiedlicher Größe des Hämoglobin Untereinheit Alpha-Gens der humanen Tonsille Nr. 2 (DH II, MH II) und der humanen Tonsille Nr. 3 (DH III, MH III).** DH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil der PIRL-Ablation. MH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil des Homogenats, gewonnen durch konventionelle Homogenisierung. Ordinate: relative Proteinmenge [a.u.]. Abszisse: Molekülmasse [kDa].

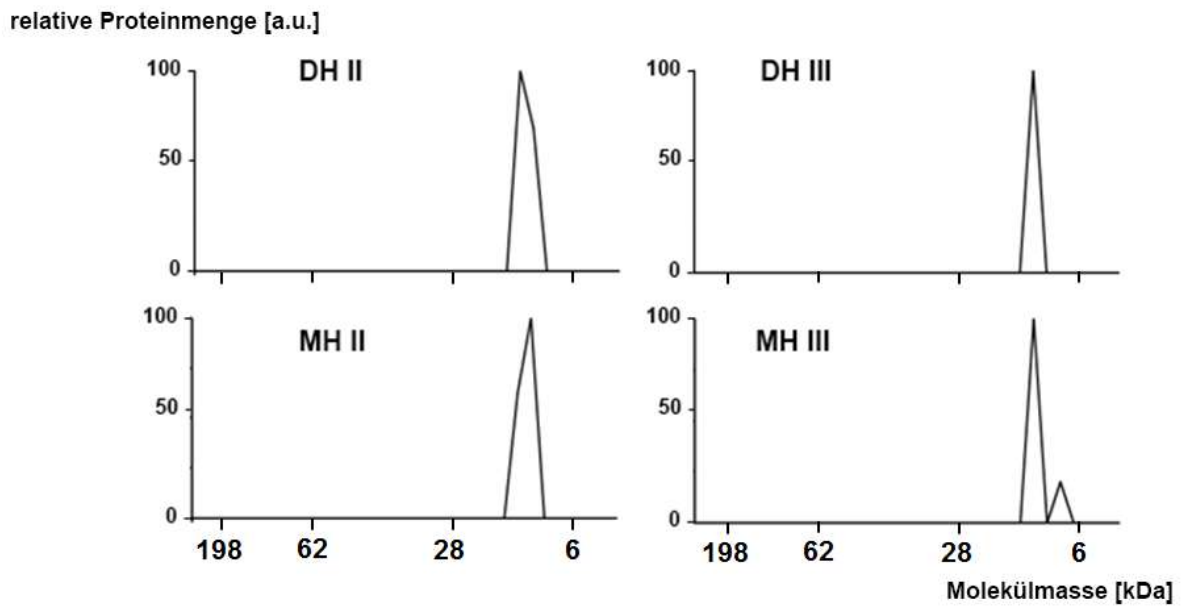


### Hämoglobin Untereinheit Beta



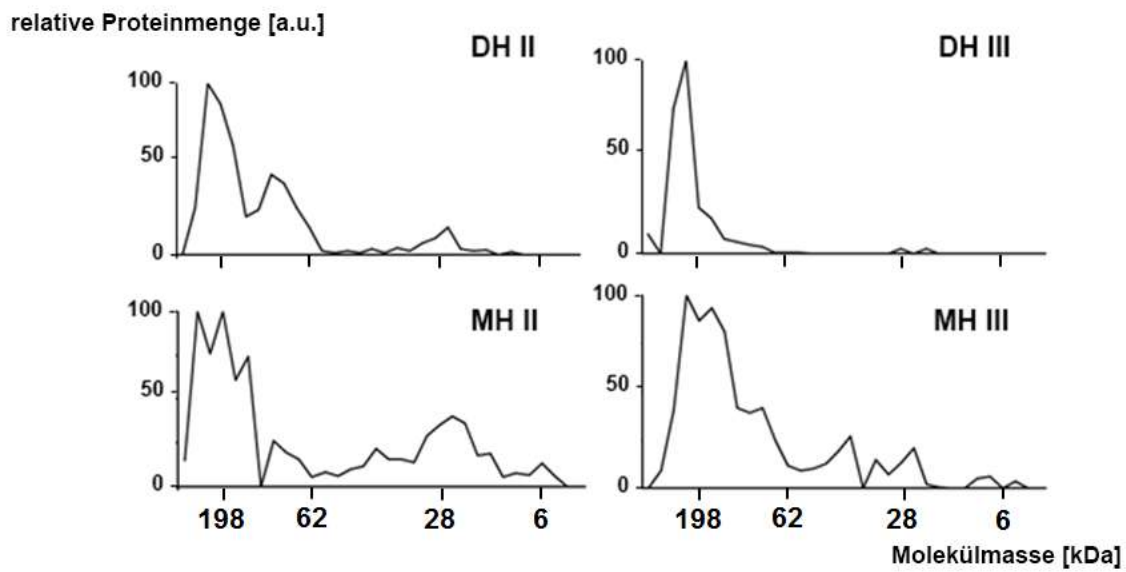
**Abbildung 51: Gelelektrophorese-Migrationsprofile für Proteinspezies unterschiedlicher Größe des Hämoglobin Untereinheit Beta-Gens der humanen Tonsille Nr. 2 (DH II, MH II) und der humanen Tonsille Nr. 3 (DH III, MH III).** DH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil der PIRL-Ablation. MH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil des Homogenats, gewonnen durch konventionelle Homogenisierung. Ordinate: relative Proteinmenge [a.u.]. Abszisse: Molekülmasse [kDa].

## Hämoglobin Untereinheit Delta

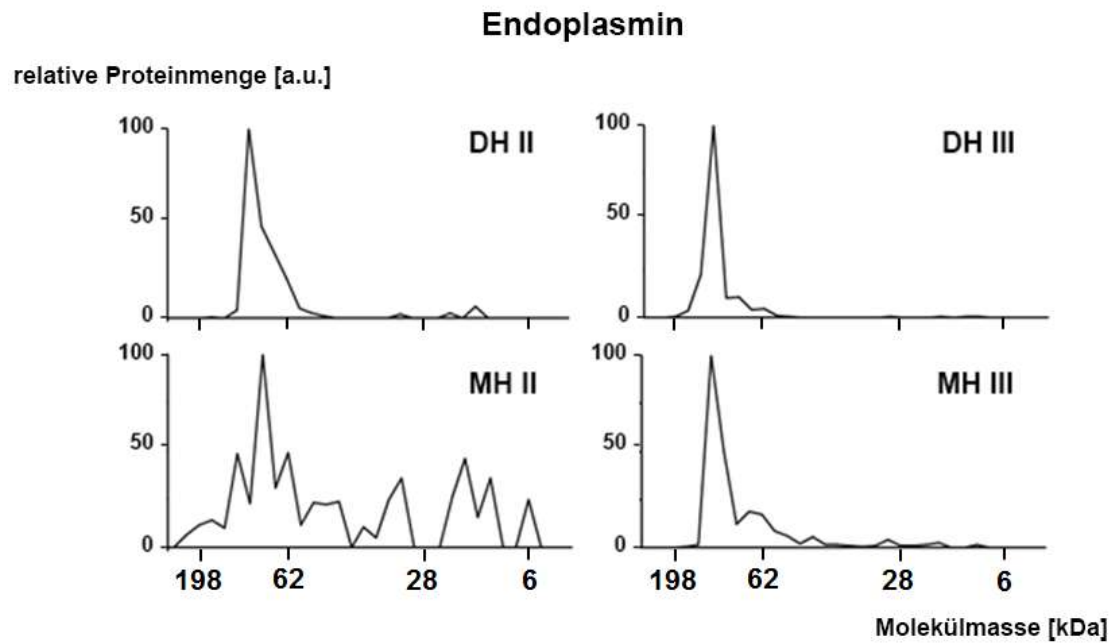


**Abbildung 52: Gelelektrophorese-Migrationsprofile für Proteinspezies unterschiedlicher Größe des Hämoglobin Untereinheit Delta-Gens der humanen Tonsille Nr. 2 (DH II, MH II) und der humanen Tonsille Nr. 3 (DH III, MH III).** DH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil der PIRL-Ablation. MH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil des Homogenats, gewonnen durch konventionelle Homogenisierung. Ordinate: relative Proteinmenge [a.u.]. Abszisse: Molekülmasse [kDa].

### Kollagen Alpha-3(VI) Kette

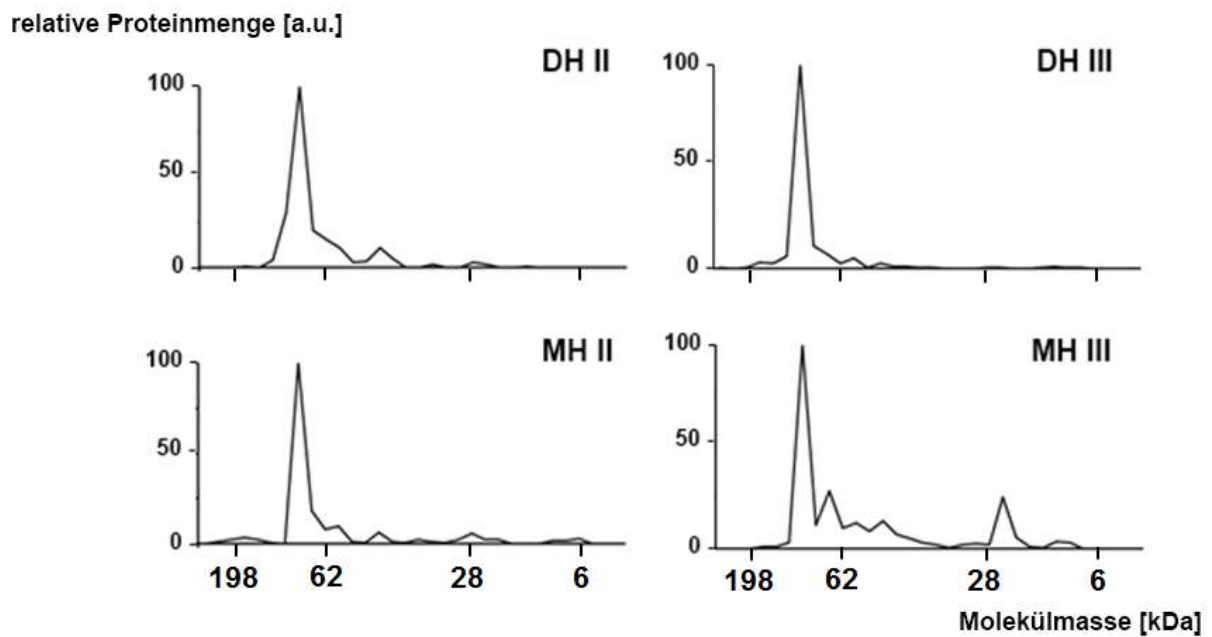


**Abbildung 53: Gelelektrophorese-Migrationsprofile für Proteinspezies unterschiedlicher Größe des Kollagen Alpha-3(VI) Kette-Gens der humanen Tonsille Nr. 2 (DH II, MH II) und der humanen Tonsille Nr. 3 (DH III, MH III). DH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil der PIRL-Ablation. MH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil des Homogenats, gewonnen durch konventionelle Homogenisierung. Ordinate: relative Proteinmenge [a.u.]. Abszisse: Molekülmasse [kDa].**

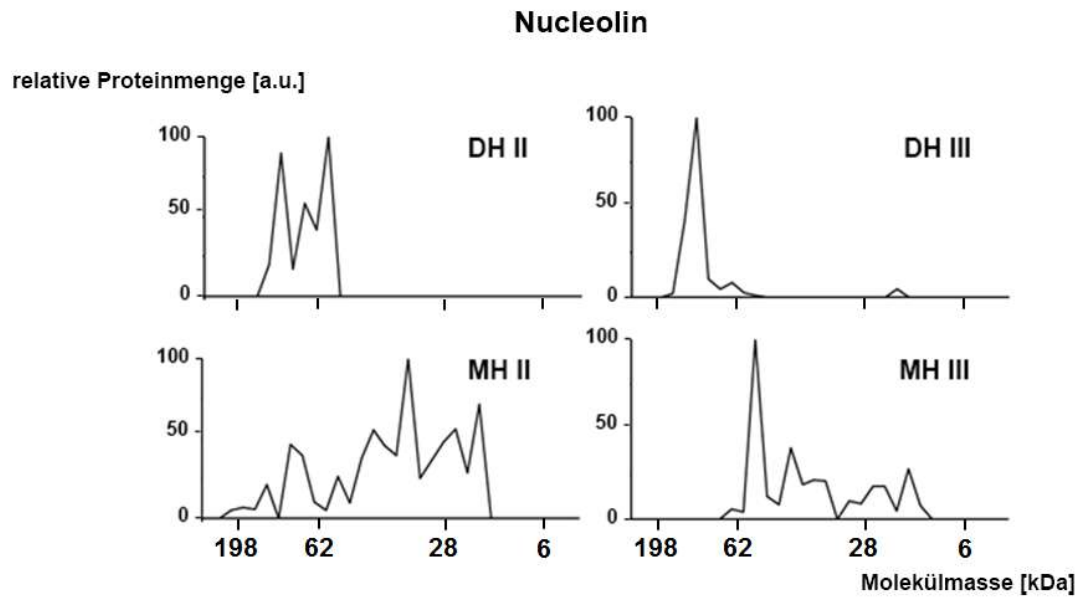


**Abbildung 54: Gelelektrophorese-Migrationsprofile für Proteinspezies unterschiedlicher Größe des Endoplasmin-Gens der humanen Tonsille Nr. 2 (DH II, MH II) und der humanen Tonsille Nr. 3 (DH III, MH III).** DH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil der PIRL-Ablation. MH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil des Homogenats, gewonnen durch konventionelle Homogenisierung. Ordinate: relative Proteinmenge [a.u.]. Abszisse: Molekülmasse [kDa].

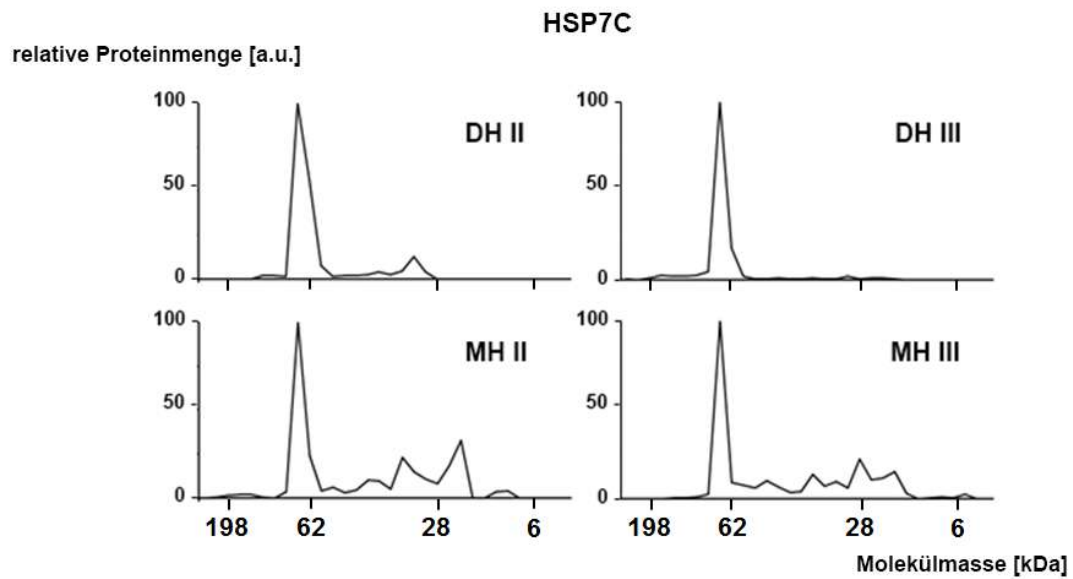
### Hitzeschockprotein HSP90-Beta



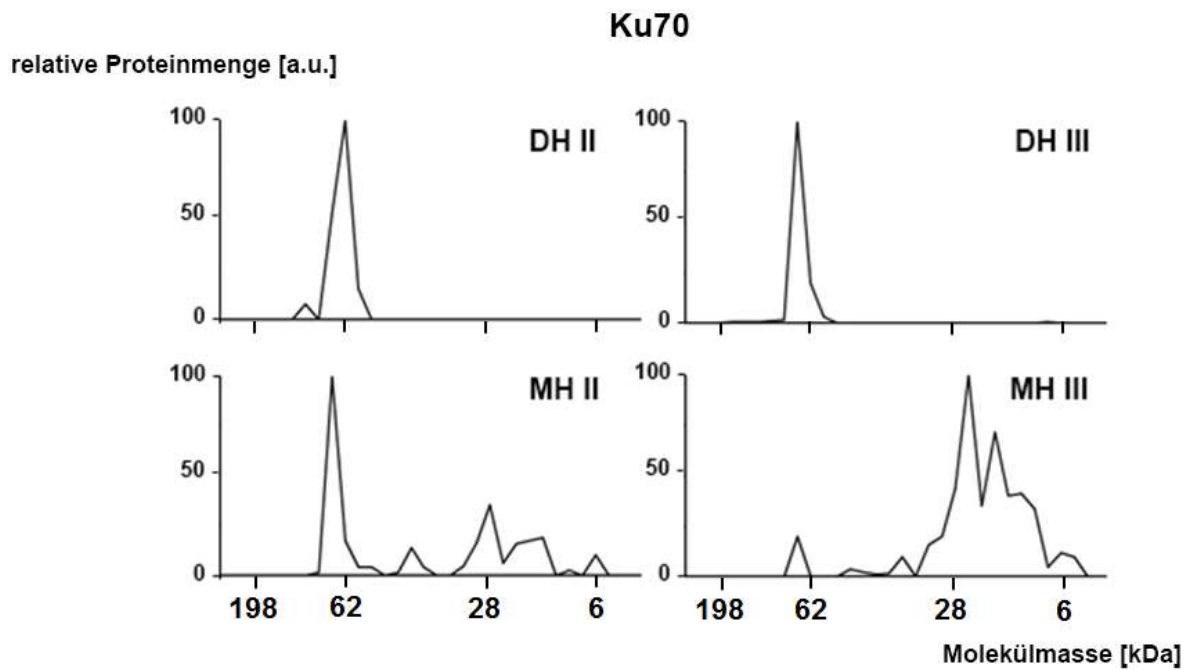
**Abbildung 55: Gelelektrophorese-Migrationsprofile für Proteinspezies unterschiedlicher Größe des Hitzeschockprotein HSP90-Beta-Gens der humanen Tonsille Nr. 2 (DH II, MH II) und der humanen Tonsille Nr. 3 (DH III, MH III).** DH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil der PIRL-Ablation. MH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil des Homogenats, gewonnen durch konventionelle Homogenisierung. Ordinate: relative Proteinmenge [a.u.]. Abszisse: Molekülmasse [kDa].



**Abbildung 56: Gelelektrophorese-Migrationsprofile für Proteinspezies unterschiedlicher Größe des Nucleolins der humanen Tonsille Nr. 2 (DH II, MH II) und der humanen Tonsille Nr. 3 (DH III, MH III). DH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil der PIRL-Ablation. MH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil des Homogenats, gewonnen durch konventionelle Homogenisierung. Ordinate: relative Proteinmenge [a.u.]. Abszisse: Molekülmasse [kDa].**

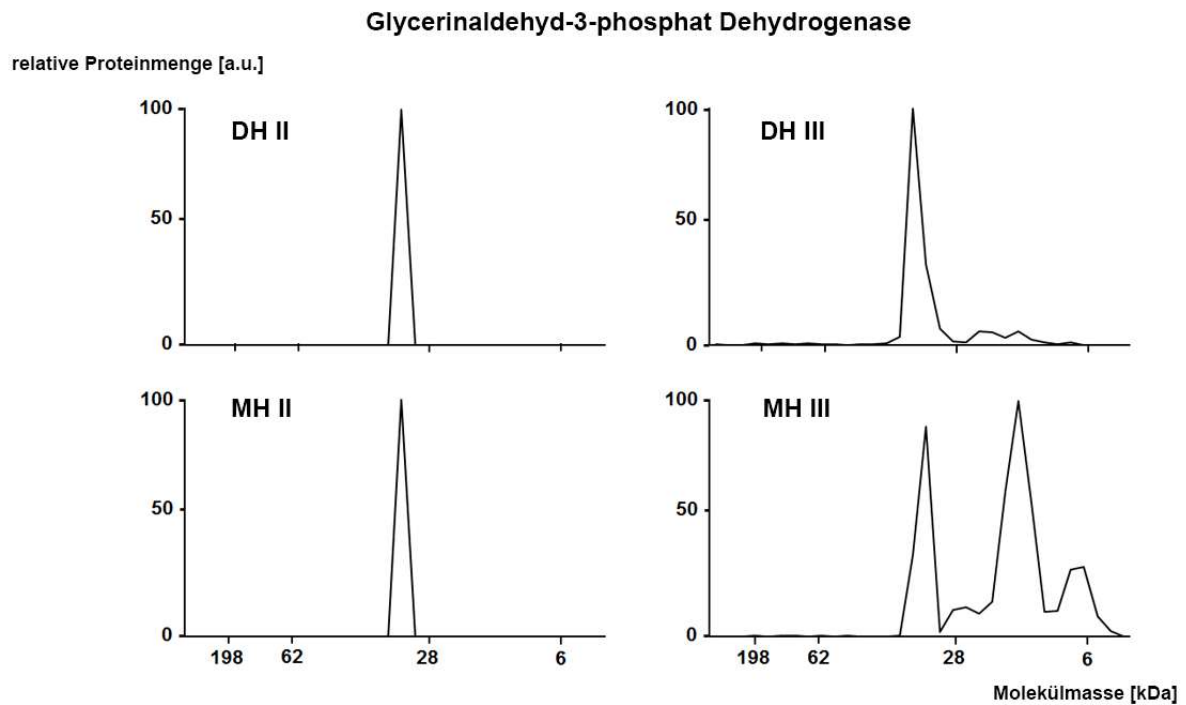


**Abbildung 57: Gelelektrophorese-Migrationsprofile für Proteinspezies unterschiedlicher Größe des HSP7C-Gens der humanen Tonsille Nr. 2 (DH II, MH II) und der humanen Tonsille Nr. 3 (DH III, MH III). DH:** Gelelektrophorese-Migrationsprofil der PIRL-Ablation. MH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil des Homogenats, gewonnen durch konventionelle Homogenisierung. Ordinate: relative Proteinmenge [a.u.]. Abszisse: Molekülmasse [kDa].

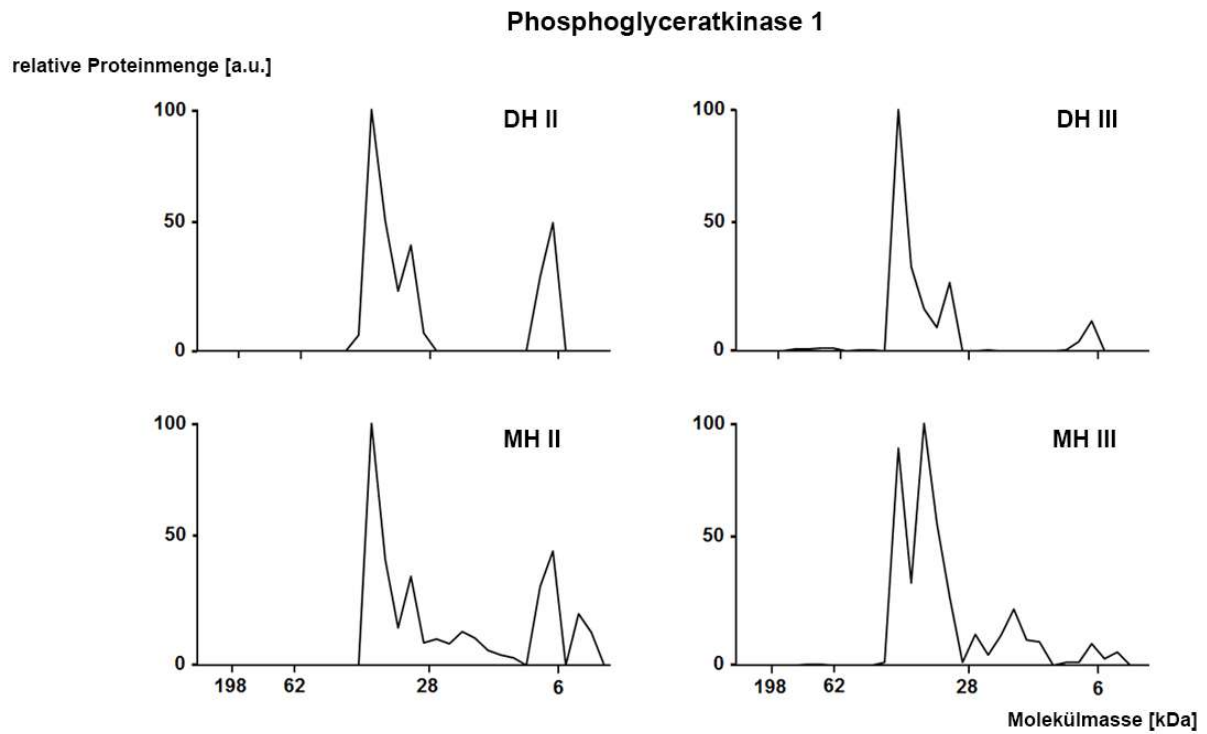


**Abbildung 58: Gelelektrophorese-Migrationsprofile für Proteinspezies unterschiedlicher Größe des Ku70-Gens der humanen Tonsille Nr. 2 (DH II, MH II) und der humanen Tonsille Nr. 3 (DH III, MH III).** DH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil der PIRL-Ablation. MH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil des Homogenats, gewonnen durch konventionelle Homogenisierung. Ordinate: relative Proteinmenge [a.u.]. Abszisse: Molekülmasse [kDa].





**Abbildung 59: Gelelektrophorese-Migrationsprofile für Proteinspezies unterschiedlicher Größe des Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase-Gens der humanen Tonsille Nr. 2 (DH II, MH II) und der humanen Tonsille Nr. 3 (DH III, MH III).** DH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil der PIRL-Ablation. MH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil des Homogenats, gewonnen durch konventionelle Homogenisierung. Ordinate: relative Proteinmenge [a.u.]. Abszisse: Molekülmasse [kDa].



**Abbildung 60: Gelelektrophorese-Migrationsprofile für Proteinspezies unterschiedlicher Größe des Phosphoglyceratkinase 1-Gens der humanen Tonsille Nr. 2 (DH II, MH II) und der humanen Tonsille Nr. 3 (DH III, MH III). DH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil der PIRL-Ablation. MH: Gelelektrophorese-Migrationsprofil des Homogenats, gewonnen durch konventionelle Homogenisierung. Ordinate: relative Proteinmenge [a.u.]. Abszisse: Molekülmasse [kDa].**

### 11.3 Tabellen

**Tabelle 12: Migrationsdistanz der Proteine in den Homogenaten der humanen Tonsille nach PIRL-DIVE-Homogenisierung (DH) und nach mechanischer Homogenisierung (MH).**

	Anzahl der Proteine mit einer Migrationsdistanz = 0	DH: Anzahl der Proteine mit einer Migrationsdistanz $\geq 2$	MH: Anzahl der Proteine mit einer Migrationsdistanz $\geq 2$
Humane Tonsille Nr. 1	643	7	281
Humane Tonsille Nr. 2	1244	47	185
Humane Tonsille Nr. 3	1258	31	415

**Tabelle 13: Grad der relativen Proteolyse [%] in den Homogenaten der humanen Tonsillen nach PIRL-DIVE-Homogenisierung (DH) und nach mechanischer Homogenisierung (MH).**

	Grad der relativen Proteolyse DH [%]	Grad der relativen Proteolyse MH [%]
Humane Tonsille Nr. 1	0,75	30,18
Humane Tonsille Nr. 2	3,19	12,53
Humane Tonsille Nr. 2	1,82	24,53

**Tabelle 14: Anzahl der Proteine, die in den Homogenaten der humanen Tonsillen nach PIRL-DIVE-Homogenisierung und nach mechanischer Homogenisierung identifiziert wurden. Für eine Proteinidentifizierung mussten mindestens zwei eindeutige Peptide pro Protein identifiziert worden sein.**

	Anzahl der identifizierten Proteine nach DIVE Homogenisierung	Anzahl der identifizierten Proteine nach mechanischer Homogenisierung
Humane Tonsille Nr. 1	1820	1113
Humane Tonsille Nr. 2	1932	2022
Humane Tonsille Nr. 2	2503	2414

## 12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Personen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Vor allem danke ich Herrn Prof. Dr. Hartmut Schlüter für die Bereitstellung des überaus interessanten Themas, für die stets mit Geduld und Freundlichkeit geführten Diskussionen sowie die intensive Betreuung und Unterstützung bei der praktischen und theoretischen Arbeit an diesem Thema.

Mein herzlicher Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Dr. Christian Betzel für die Bereitstellung zur Anfertigung des Zweitgutachtens.

Ich möchte mich auch bei Herrn Prof. Dr. Dwayne Miller bedanken, dass ich im Rahmen des ERC-Projekts die Möglichkeit hatte, mit dem Pikosekunden-Infrarot-Laser zu arbeiten.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. Friedrich Buck für die überaus spannenden Diskussionen bedanken, aus denen ich sehr viel mitgenommen habe.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Physikerinnen Ling Ren und Stephanie Uschold sowie den Physikern Dr. Nils-Owe Hansen und Sebastian Kruber aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dwayne Miller bedanken, dass sie bei den Ablationsexperimenten den PIRL bedient haben. Dr. Hannes Petersen (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Rainald Knecht) danke ich für das Bereitstellen der Tonsillen und Tobias Gosau (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Udo Schumacher) danke ich für das Durchführen der histologischen Färbungen. PD Dr. Andrea Horst danke ich für das Bereitstellen der Mausgewebe und das Anfertigen des CEACAM 1 Western Blots. Darüber hinaus möchte ich mich bei Dr. Karola Lehmann von der Proteome Factory für das Anfertigen der 2DE-Gele bedanken.

Meinen ganz besonderen Dank spreche ich meiner Familie und vor allem meiner Mutter aus, die mich in all den Jahren nach allen Kräften unterstützt hat. Ich möchte mich bei meiner Lebensgefährtin Madlen Hotze von ganzem Herzen für ihre Unterstützung und vor allem für

ihre Geduld bedanken, die Sie während der Zeit aufgebracht hat, in der ich meine Dissertationsschrift verfasst habe.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Kollegen Sönke Harder, Pascal Steffen, Marcus Wurlitzer, Olga Krauss und Laura Heikau für die überaus nette Labor- und Büroatmosphäre danken.

### 13 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ich versichere außerdem, dass diese Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch nie einer Prüfungsstelle zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt wurde. Es wurden keine früheren Promotionsversuche meinerseits unternommen.

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'M' followed by a series of connected loops and a long horizontal stroke extending to the right.

---

Hamburg, den 16.12.2015

## **14 KMR-Stoffe**

In dieser Arbeit wurden keine krebserzeugenden, erbgutveränderten oder fortpflanzungsgefährdenden Stoffe (KMR-Stoffe) der Kategorie GHS 1A und 1B verwendet.