

**Methodische Entwicklungen zur Analyse von O- und N-
Phosphorylierungen in Signalnetzwerken
mittels Massenspektrometrie**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Dr. rer. nat.

von der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen

der Technischen Universität Dortmund

genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Clarissa Dickhut

aus

Lippstadt

Tag der mündlichen Prüfung: 13.03.2017

1. Gutachter: Prof. Dr. Albert Sickmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Tiller

Dortmund 2017

1. Prüfer: Prof. Dr. Oliver Kayser

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Das Proteom	1
1.1.1.	O- und N-Phosphorylierungen	1
1.1.2.	N-Phosphorylierung von Histidin.....	3
1.2.	LC-MS basierte Proteomanalysen.....	6
1.2.1.	Die Proteomik in klinischen Fragestellungen.....	9
1.2.2.	Chronische lymphatische Leukämie.....	9
1.3.	Grundlagen der Flüssigchromatographie	11
1.4.	Massenspektrometrie in der Proteinanalytik	13
1.4.1.	Massenanalytoren und Fragmentierungsarten.....	14
1.4.2.	Datenanalyse	16
1.5.	Strategien der quantitativen Proteomanalyse	17
1.5.1.	Markierungsfreie Quantifizierung	18
1.5.2.	Quantifizierung mittels Stabil-Isotopenmarkierung	19
1.6.	Anreicherungsstrategien für Phosphopeptide.....	21
1.6.1.	Titandioxid-basierte Anreicherung.....	21
1.6.2.	Chromatographische Anreicherungsverfahren	22
1.6.3.	Anreicherungsstrategien von Phosphohistidin	24
2.	Zielsetzung	26
3.	Material und Methoden	27
3.1.	Material	27
3.2.	Methoden.....	31
3.2.1.	Aufreinigung von B-Zellen und CLL-Zellen	31
3.2.2.	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	32
3.2.3.	Probenvorbereitungsschritte	33
3.2.4.	Stabil-Isotopenmarkierung mittels iTRAQ	39
3.2.5.	Verwendete Anreicherungstechniken für phosphorylierte Peptide	41
3.2.6.	Fraktionierung mittels Umkehrphasen-Chromatographie bei pH 6	49
3.2.7.	LC-MS Methoden.....	49
3.2.8.	Datenbanksuchen und Dateninterpretation.....	51
3.2.9.	Antikörper-basierter Nachweis von Phosphohistidin	54

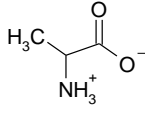
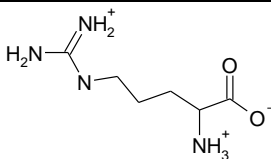
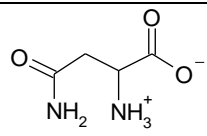
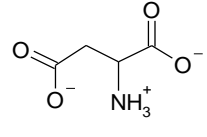
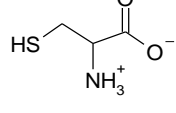
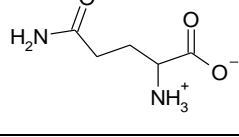
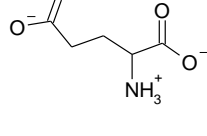
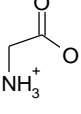
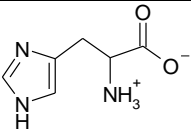
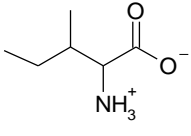
4.	Ergebnisse	57
4.1.	Optimierung der O-Phosphopeptidanreicherung.....	57
4.1.1.	Anreicherung von geringen Probenmengen	59
4.1.2.	Etablierung des HILIC-Systems.....	61
4.1.3.	Optimierungsprozesse am HILIC-System.....	62
4.2.	Analyse und Optimierung des Verdaus von Phosphoproteinen	64
4.2.1.	Einfluss verschiedener Verdaubedingungen	66
4.2.2.	Beinflussbarkeit von <i>large-scale</i> Phosphoproteomstudien	68
4.3.	Analyse des Phosphoproteoms von CLL-Zellen.....	71
4.3.1.	Initiale Experimente	71
4.3.2.	Quantifizierung der Protein- und Phosphoproteinlevel.....	73
4.4.	Nachweis von Phosphohistidin	79
4.4.1.	Antikörper-basierter Nachweis von pHis	79
4.4.2.	Optimierung des LC-MS basierten pHis-Nachweises.....	81
4.4.3.	Indirekter Phosphohistidinnachweis mittels SCX	88
4.4.4.	Direkter Phosphohistidinnachweis mittels ERLIC.....	92
5.	Diskussion	100
5.1.	Charakterisierung und Optimierung des Phosphoproteinverdaus	100
5.2.	Optimierung der Phosphopeptidanreicherung	103
5.3.	Aktuelle Herausforderungen bei klinischen Fragestellungen - am Beispiel der CLL.....	105
5.3.1.	Validierung der iTRAQ-CLL-Daten	106
5.3.2.	Vorhersage einer möglichen biologischen Relevanz der Veränderungen.....	109
5.4.	Etablierung eines LC-MS basierten pHis-Nachweises.....	112
5.4.1.	Validierung des indirekten SCX-Nachweisverfahrens.....	114
5.4.2.	Herausforderungen der pHis-Identifizierung <i>in E. coli</i>	115
6.	Zusammenfassung.....	119
7.	Summary	120
8.	Literaturverzeichnis.....	121
9.	Danksagung.....	132
10.	Lebenslauf.....	133
11.	Erklärung.....	134
12.	Anhang	135

I Abkürzungsverzeichnis

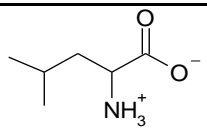
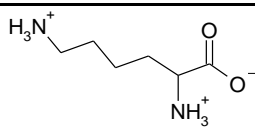
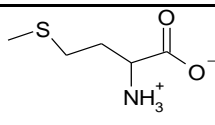
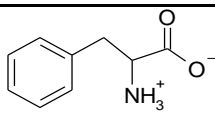
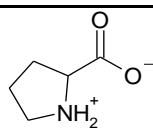
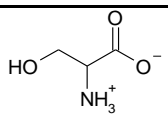
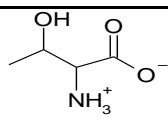
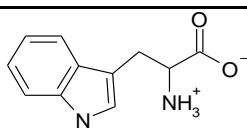
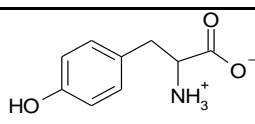
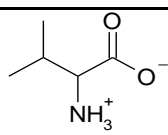
↑↓	Hoch-/Runterregulation
ABC	Ammoniumbicarbonat
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AX	Anionenaustauscher
BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
BCR	B-Zellrezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BTK	Bruton-Tyrosinkinase
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CID	<i>Collision induced dissociation</i>
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
Da	Dalton
DDA	Datenabhängige Akquisition (<i>data-dependent acquisition</i>)
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DIA	Datenunabhängige Akquisition (<i>data-independent acquisition</i>)
DTT	Dithiothreitol
ERLIC	<i>Electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
ETD	Elektronentransferdissoziation (<i>electron transfer dissociation</i>)
FA	Ameisensäure (<i>formic acid</i>)
FASP	<i>Filter assisted sample preparation</i>
FDR	Falsch-positive Identifikationsrate (<i>false discovery rate</i>)
Gu-HCl	Guanidinhydrochlorid
HCD	<i>Higher-energy collisional dissociation</i>
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie (<i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i>)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IAA	Iodacetamid
Ibr	Ibrutinib
IgM	Immunglobulin M
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie

IP	Immunpräzipitation
iTRAQ	<i>Isobaric tag for relative and absolute quantitation</i>
LC	Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
LDS	Lithiumdodecylsulfat
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
mIgVH	Mutiertes IgVH-Gen (<i>Immunoglobulin heavy-chain variable-region gene</i>)
MS	Massenspektrometrie
MS ¹	Übersichtsspektrum
MS ² – MS/MS	Fragmentationenspektrum
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEP-PTS	Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferasesystem
PMF	Peptidmassenfingerprint
PP	Kaliumphosphoramidat (<i>potassium phosphoramidate</i>)
PRM	<i>Parallel reaction monitoring</i>
PSM	<i>Peptide spectrum match</i>
PTM	Posttranslationale Modifikation
pTze	Phosphoryl-Triazolylethylamin
pTza	Phosphoryl-Triazolylalanin
pPye	Phosphono-Pyrazolylethylamin
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
SCX	Starker Kationenaustauscher (<i>strong cation exchange</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SILAC	<i>Stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
SIMAC	<i>Sequential elution from IMAC</i>
SPE	Festphasenextraktion (<i>solid phase extraction</i>)
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
TEAP	Triethylammoniumphosphat
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluoroacetic acid</i>)
TFE	Trifluoroethanol
TiO ₂	Titandioxid
uIgVH	Unmutiertes IgVH-Gen (<i>Immunoglobulin heavy-chain variable-region gene</i>)
XIC	Extrahiertes Ionenchromatogramm (<i>extracted ion chromatogram</i>)

II Aminosäuren

Name	Buchstabencode	Strukturformel	Monoisotopische Masse (-H ₂ O) [Da]
Alanin	Ala, A		71,03711
Arginin	Arg, R		156,10111
Asparagin	Asn, N		114,04293
Asparaginsäure	Asp, D		115,02694
Cystein	Cys, C		103,00919
Glutamin	Gln, Q		128,05858
Glutaminsäure	Glu, E		129,04259
Glycin	Gly, G		57,02146
Histidin	His, H		137,05891
Isoleucin	Ile, I		113,08406

Aminosäuren

Leucin	Leu, L		113,08406
Lysin	Lys, K		128,09496
Methionin	Met, M		131,04049
Phenylalanin	Phe, F		147,06841
Prolin	Pro, P		97,05276
Serin	Ser, S		87,03203
Threonin	Thr, T		101,04768
Tryptophan	Trp, W		186,07931
Tyrosin	Tyr, Y		163,06333
Valin	Val, V		99,06841

III Veröffentlichungen

Zu der Arbeit zugehörige Publikationen

Dickhut, C., Feldmann, I., Lambert, J., Zahedi, R. P., *Impact of digestion conditions on phosphoproteomics*. J Proteome Res, 2014, 13(6):2761-67

Dickhut, C., Radau, S., Zahedi, R. P., *Fast, efficient, and quality-controlled phosphopeptide enrichment from minute sample amounts using titanium dioxide*. Methods Mol Biol, 2014, 1156:417-30

Weitere Publikationen

Gavriljuk, K., Schartner, J., Seidel, H., Dickhut, C., Zahedi, R. P., Hedberg, C., Kötting, C., Gerwert, K., *Unraveling the Phosphocholination Mechanism of the Legionella pneumophila Enzyme AnkX*. Biochemistry, 2016, 55(31):4375-85

Gonczarowska-Jorge, H., Dell'Aica, M., Dickhut, C., Zahedi, R. P., *Variable digestion strategies for phosphoproteomics analysis*. Methods Mol Biol, 2016, 1355:225-39

Chatterji B., Dickhut C., Mielke S., Krüger J., Just I., Glage S., Meier M., Wedekind D., Pich A., *MALDI imaging mass spectrometry to investigate endogenous peptides in an animal model of Usher's disease*. Proteomics, 2014, 14(13-14):1674-87

Dickhut, C., Loroch, S., Zahedi, R. P., Sickmann, A., *Phosphoproteomics - more than meets the eye*. Electrophoresis, 2013, 34(11):1483-92

IV Vorträge und Poster

Vorträge

22. Arbeitstagung Mikromethoden in der Proteinchemie, Dortmund 2015

„Quantitative klinische Proteomics zeigt Veränderungen des (Phospho-)Proteoms in Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie auf“

Forschungszentrum CECAD, Köln 2014

„Proteomic analysis of changes in chronic lymphocytic leukemia“

ISAS Summer School, Dortmund 2014

„Exploring phosphocholination as a post-translational modification by mass spectrometry“

Doktorandenforum der Leibniz-Gemeinschaft, Berlin 2013

„Impact of digestion conditions on phosphoproteomics“

ISAS Summer School, Dortmund 2012

„Chasing phosphohistidine – Analysis of N-phosphorylation by mass spectrometry“

Poster

ASMS, Baltimore 2014

„Alternative strategies to analyze post-translational modifications“

EUPA, Saint-Malo 2013

„Impact of digestion conditions on phosphoproteomics“

Proteomic Forum, Berlin 2013

„Impact of digestion conditions on phosphoproteomics“

bio.Dortmund, Dortmund, 2012

„Quantitative analysis of PTMs in signalling events“

1. Einleitung

1.1. Das Proteom

Der Begriff „Proteom“ wurde vor mehr als 20 Jahren von dem Australier Marc R. Wilkins geprägt und stellt eine Wortneuschöpfung basierend auf der Formulierung „*PROTEeins expressed by a genOME*“ dar. Per Definition beschreibt das Proteom alle Proteinspezies, die zu einem definierten Zeitpunkt und unter definierten Bedingungen Bestandteil einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus sind [1-2]. Die Komplexität des Proteoms wird deutlich, wenn man die große Anzahl an Proteinspezies, mehr als 10.000 verschiedene Proteine, und deren dynamischen Bereich in humanen Zellen betrachtet. Proteinabundanzen in einer einzigen Zelle können sich um mehrere Größenordnungen (bis zu 7) unterscheiden und somit wenige bis mehrere Millionen Kopien pro Zelle umfassen [3-4].

Ausgehend vom Genom, dem Erbgut, das die genetischen Informationen einer Zelle trägt, wird zunächst mRNA produziert (Transkription) aus der anschließend Proteine erstellt werden (Translation). Das Proteom ist hoch dynamisch, es verändert sich im Laufe der Entwicklung (Neusynthese, Abbau, Modifikationen) sowie aufgrund äußerer Einflüsse und bestimmt so den Phänotyp eines jeden Lebewesens. Gründe für Veränderungen im Proteom können z. B. eine veränderte Transkription durch alternative Splicingprozesse oder Änderungen auf posttranslationaler Ebene durch das Einbringen von posttranslationalen Proteinmodifikationen (PTMs) wie Phosphorylierungen oder Acetylierungen sein. Proteinmodifikationen verändern nicht nur die Proteinstruktur, sondern zum Teil auch das Verteilungsmuster von Proteinen in der Zelle und somit deren Interaktionseigenschaften. Während Änderungen in der Transkription erst nach einigen Stunden zu Veränderungen der Proteinabundanz führen, kann über posttranslationale Modifikationen eine Aktivierung, Deaktivierung sowie eine Änderung der Funktion oder ein Abbau von Proteinen innerhalb weniger Sekunden eintreten [5].

In humanen Zellen sind ~450 PTMs bekannt (Datenbank UniProt), von denen die Proteinphosphorylierung vermutlich die höchst abundante und wichtigste ist [6]. Weitere wichtige PTMs sind Glykosylierungen sowie auch Ubiquitinierungen, Acetylierungen und Methylierungen von Lysin [7-8].

1.1.1. O- und N-Phosphorylierungen

Es wird angenommen, dass etwa 30 % der Proteine in einer Säugetierzelle zu jedem Zeitpunkt phosphoryliert vorliegen [9]. Basierend auf den Angaben der Datenbank www.phosphosite.org konnte bei etwa 17.500 Genprodukten eine Phosphorylierungsstelle nachgewiesen werden [8].

Phosphorylierungen beeinflussen nicht nur die Proteinstruktur und somit direkt Protein-Protein-Interaktionen, sie spielen auch eine entscheidende Rolle in der Signalweiterleitung und in zellulären Prozessen wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose. Eine abnormale Phosphorylierung kann zur

Entstehung von Krankheiten beitragen, den Therapieerfolg beeinflussen und wird oft im Zusammenhang mit Krebserkrankungen diskutiert. Die Regulation der Phosphorylierung des Wachstumsfaktors-Rezeptors HER2 und seiner Interaktionspartner scheint u.a. eine entscheidende Rolle für den Therapieerfolg bei Behandlung von Brustkrebspatienten mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Handelsname Herceptin) zu spielen [10].

Die Phosphorylierung von Proteinen gehört zu den PTMs und ist ein reversibler Prozess. Sie wird über Kinasen induziert, die Dephosphorylierung über Phosphatasen. Eine temporäre Phosphorylierung von Proteinen kann somit als molekularer An- oder Ausschalter der Proteinaktivität dienen (siehe Abbildung 1-1).

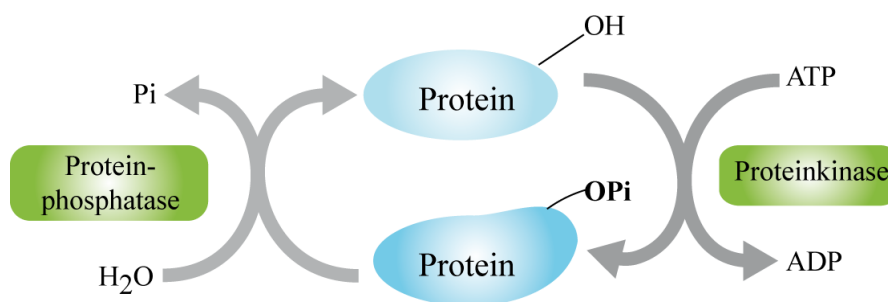


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der reversiblen Phosphorylierung von Proteinen über Kinasen und Phosphatasen. Hierbei wird eine Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat (ATP, auch über Guanosintriphosphat GTP möglich) auf das Zielprotein übertragen. Bei der Dephosphorylierung über Phosphatasen wird anorganisches Phosphat freigesetzt.

Aus chemischer Sicht werden durch die Addition einer Phosphatgruppe negative Ladungen in das Protein eingebracht. Dies führt zu einer Änderung der Nettoladung des Proteins, was eine Konformationsänderung, z. B. durch Abstoßung von negativ geladenen benachbarten Seitenketten innerhalb eines Proteins, zur Folge haben, aber auch Protein-Protein-Interaktionen beeinflussen kann. Die Addition der Phosphatgruppe erfolgt in eukaryotischen Zellen typischerweise an der Hydroxygruppe der Seitenkette der Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin. Hierbei entstehen Phosphomonoester, die sogenannten O-Phosphorylierungen. In Säugetierzellen wird ein Verhältnis dieser Phosphorylierungen von etwa 86:12:2 % für pSer, pThr und pTyr angenommen. In Abhängigkeit von der verwendeten Nachweismethode unterscheiden sich vor allem die Werte für den Anteil von Phosphotyrosin geringfügig [11].

Ausgehend von der Entdeckung von Phosphotyrosin [12], haben die Arbeiten von Hunter *et al.* maßgeblich zum Verständnis des Vorkommens und der Funktion von Proteinkinasen beigetragen [13]. In Studien zu *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass etwa 2 % aller Gene in Eukaryoten für Proteinkinasen kodieren [14].

In Prokaryoten dominieren Phosphorylierungen der Aminosäuren Histidin, Arginin und Lysin sowie Aspartat. Da eine Phosphorylierung von Histidin, Arginin und Lysin am Stickstoff der Seitenkette stattfindet, wird sie als N-Phosphorylierung bezeichnet. Die resultierende P-N Bindung ist eine Phosphoamidatbindung. Bei der Phosphorylierung von Aspartat entsteht ein Acylphosphat. Eine Übersicht über bereits identifizierte phosphorylierte Aminosäuren und ihre chemische Stabilität ist in Tabelle 1-1 dargestellt.

Tabelle 1-1: Chemische Stabilität von phosphorylierten Aminosäuren (modifiziert nach [15]).

Phosphoaminosäure	Stabilität in	
	Säuren	Basen
O-Phosphate		
Phosphoserin	+	+
Phosphothreonin	+	+/-
Phosphotyrosin	+	+
N-Phosphate		
Phosphoarginin	-	-
Phosphohistidin	-	+
Phospholysin	-	+
Acylphosphate		
Phosphoaspartat	-	-
Phosphoglutamat	-	-
S-Phosphate		
Phosphocystein	(+)	+

Zusätzlich zu den aufgelisteten phosphorylierten Aminosäuren konnten auch noch O-Phosphohydroxyprolin [16] und O-Phosphohydroxylysin [17] detektiert werden, die ebenfalls unter sauren Bedingungen stabil sind.

Bei den N-Phosphorylierungen ist lediglich die Rolle von Phosphoarginin (pArg) in Prokaryoten gut charakterisiert: pArg und die Argininkinase McsB sind in die Regulation der Stressantwort und den Proteinabbau bei *Bacillus subtilis* involviert [18-19].

1.1.2. N-Phosphorylierung von Histidin

Bereits 1962 wurde der biochemische Nachweis für eine endogene Phosphorylierung der Aminosäure Histidin (pHis) über den Einbau von radioaktivem ³²P von Paul D. Boyer erbracht [20]. Mittels Ionenaustausch-Chromatographie konnte einige Jahre später gezeigt werden, dass zwei Isomere, 1-Phosphohistidin (1-pHis) und 3-Phosphohistidin (3-pHis), existieren, benannt nach der Position des phosphorylierten Stickstoffs am Imidazolring (siehe Abbildung 1-2). 3-pHis stellt das thermodynamisch

favorisierte Produkt dar. Eine Zwischenstufe, das 1,3-Diphosphohistidin, konnte lediglich nach chemischer Phosphorylierung nachgewiesen werden [21].

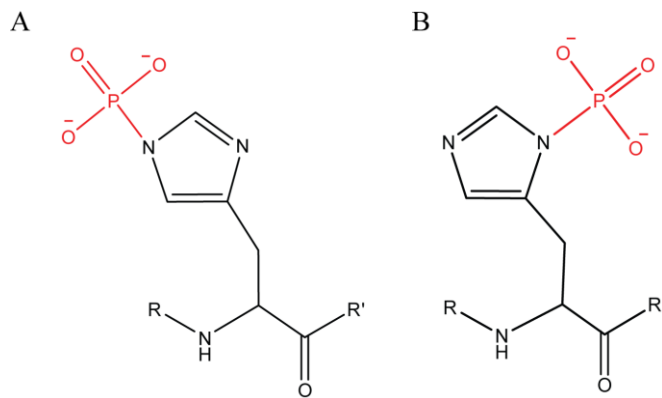


Abbildung 1-2: Strukturformeln von Phosphohistidin. Dargestellt sind die zwei Isomere von pHis: (A) 3-Phosphohistidin und (B) 1-Phosphohistidin.

Die Rolle von Phosphohistidin in biologischen Systemen ist weitgehend unbekannt. Dies liegt vor allem an der chemischen Instabilität der Phosphoamidatbindung. Die P-N Bindung ist instabiler als die P-O Bindung, da eine Protonierung des Stickstoffs der P-N Bindung die Dissoziation der Phosphatgruppe erleichtert, was ihre Instabilität gegenüber Säuren (siehe Tabelle 1-1) erklärt [22]. Die Halbwertszeit der P-N Bindung beträgt bei pH 3 und RT etwa 30 min [23], während sie in 1 M HCl bei 49 °C unter 25 s liegt [24].

Diese Eigenschaften der N-Phosphorylierung ermöglichen einerseits eine schnelle und hoch dynamische Weitergabe von Signalen, erschweren aber andererseits die Untersuchung und Charakterisierung der Proteinphosphorylierung an Histidin und ihrer Funktionen [22].

In Prokaryoten, Pilzen und Pflanzen erfolgt die Signalweiterleitung, anders als in höheren Eukaryoten, über Zwei-Komponenten-Systeme und Phosphorelay-Systeme, die auf der Phosphorylierung von Histidin und Aspartat beruhen [25-26]. Prokaryoten können über diese Systeme auf Änderungen der Osmolarität, Temperatur und Nährstoffverfügbarkeit reagieren. Beide Systeme weisen einen Membran-assoziierten Rezeptor auf, der auf der zytoplasmatischen Seite eine Histidinkinase-Domäne besitzt. Als Phosphat-Akzeptor dient ein hoch konserviertes Aspartat in einem Empfängerprotein, dem sogenannten „*Response Regulator*“ (siehe Abbildung 1-3).

Bei Phosphorelay-Systemen sind weitere Proteine in die Signalkaskade involviert, sodass die Phosphatgruppe zwischen mehreren Histidin- und Aspartatresten transferiert wird. Hierdurch werden eine Feinregulation der Antwort sowie eine weitere Auffächerung des Signals ermöglicht.

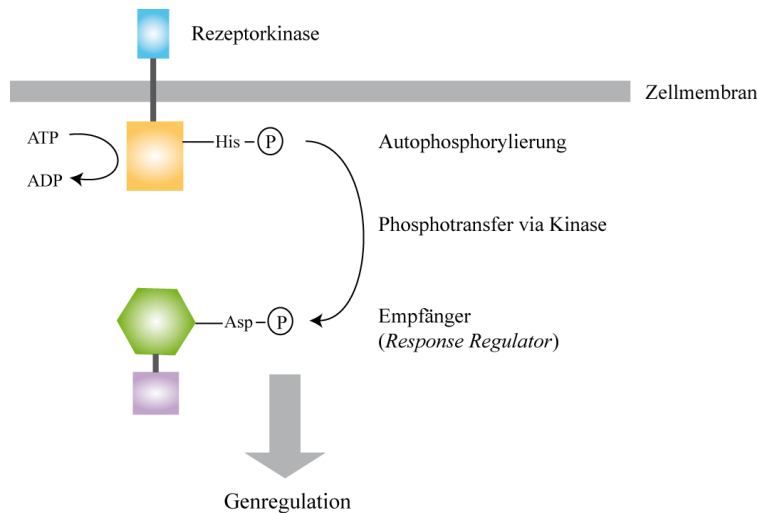


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Signalweiterleitung über ein Zwei-Komponenten-System, wie es in Prokaryoten vorkommt.

In gram-negativen Bakterien existieren zudem Stofftransportsysteme wie das Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase (PEP-PTS) System, welches u.a. in *Escherichia coli* (*E. coli*) vorkommt und die Aufnahme von Einfachzuckern in die Zellen reguliert. Hierbei liefert nicht ATP, sondern Phosphoenolpyruvat ein anorganisches Phosphat, welches über eine Proteinkaskade zunächst zur Aufnahme und anschließend zur Phosphorylierung des Einfachzuckers, wie Glukose oder Mannose, führt [27-29]. Basierend auf experimentellen Ergebnissen, Sequenz- und Homologievergleichen mit anderen bekannten Phosphorylierungsstellen konnten in *E. coli* bislang 63 Proteine mit einer Phosphorylierung an Histidin nachgewiesen werden (Datenbank UniProt). Von diesen pHis-Proteinen sind 27 in PEP-PTS Signalwege involviert [30].

Die Analyse von nukleären Proteinen des Modellorganismus *Physarum polycephalum*, einer Schleimpilz-Art, haben ergeben, dass Phosphohistidin für etwa 6 % aller Proteinphosphorylierungen in niederen Eukaryoten verantwortlich sein könnte [31]. Auch wenn diese Aussage zum Teil auf Sequenzhomologien zu prokaryotischen Systemen beruht, scheint die biologische Signifikanz von Phosphohistidin bisher unterschätzt zu werden. Die Diskrepanz zwischen sequenzbasierten Vorhersagen und validierten experimentellen Ergebnissen ist mit der chemischen Instabilität der Phosphoamidatbindung zu erklären, aber auch mit den Einschränkungen der vorhandenen Antikörper-basierten Techniken, die oft nur hochabundante Proteine nachweisen können.

In Säugetieren liegen bislang nur wenige Daten zu Histidinphosphorylierungen vor, u.a. konnten die Nucleosid-Diphosphat-Kinasen A (NME1) und B (NME2) als Histidinkinasen identifiziert werden [32-33]. Als ihre Substrate gelten unter anderem die ATP Citratlyase [33], Annexin 1 [34] und der Kaliumkanal KCa 3.1 [35]. Besonders interessant ist, dass die Phosphorylierung von His358 im Carboxyterminus von KCa 3.1 zu einer direkten Aktivierung des Kanals führt, was im Gegensatz zur

Rolle der Histidinphosphorylierung in Zwei-Komponenten-Systemen steht, in denen sie lediglich als Intermediate dienen. Als negativer Regulator dieser Phosphorylierungsstelle wurde die pHis spezifische Phosphatase (PHPT1) identifiziert [36]. Die kürzlich erfolgte Generierung von spezifischen, monoklonalen anti-pHis Antikörpern gegen 1-pHis sowie 3-pHis wird in Zukunft die Untersuchung der unterschiedlichen biologischen Funktionen der Isomere ermöglichen und umfassendere Daten zur Abundanz von pHis in höheren Eukaryoten liefern können. Mittels Immunfluoreszenzanalysen sowie Immunpräzipitation konnten bereits erste neuartige Einblicke in die Rolle von pHis in eukaryotischen Zellen gewonnen werden, die auf eine wichtige Funktion von pHis während der Zellteilung sowie bei der Phagozytose hinweisen [37].

1.2. LC-MS basierte Proteomanalysen

In den Anfängen der Proteinanalyse, Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts, erfolgte die Analyse über eine Sequenzierung einzelner Proteine mittels des sogenannten Edman-Abbaus [38]. Gelbasierte Verfahren, wie die 2D Gelelektrophorese, stellten die ersten globalen Ansätze zur Proteomanalyse dar, mit denen unterschiedliche Proteinabundanzen detektiert und Proteine durch einen Vergleich mit Referenzdaten identifiziert werden konnten. Jedoch stellte sich heraus, dass neben einem hohen Zeitaufwand und einer geringen Reproduzierbarkeit dieses Verfahrens, auch die Auflösung der orthogonalen Trennung der zwei Dimensionen für Proteinexpressionsstudien nicht ausreichend war, sodass häufig eine Überlagerung von mehreren Proteinen in einem Gelspot vorlag [39].

Erleichtert wurde die Identifizierung von Proteinen mit der Entwicklung des Peptidmassenfingerprints (PMF) [40-41]. Bei diesem Verfahren werden die meist mittels Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine zunächst aufgereinigt und enzymatisch verdaut, sodass Peptide entstehen. Die eigentliche Identifizierung erfolgt über die Bestimmung des Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) der Peptide im Massenspektrometer (MS). Typischerweise wird MALDI (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation) Massenspektrometrie eingesetzt, in der die Analyten nach Kokristallisation mit einer organischen Matrix mittels Stickstofflaser in die Gasphase überführt werden [42]. Ein Abgleich mit *in silico* generierten Spektren, die in einer Proteindatenbank abgelegt sind, ermöglicht die Identifizierung des Proteins, sodass eine zeitaufwendige Proteinsequenzierung auf Aminosäureebene entfällt, da jedes Protein ein spezifisches Muster generiert, ähnlich einzigartig wie der menschliche Fingerabdruck. Die Limitierung dieser Methode besteht vor allem in der geringen Selektivität der Identifizierung, da lediglich die m/z der verdauten Peptide als Identifizierungskriterium dienen. Die Identifizierung von Peptiden mittels PMF ist somit auf aufgereinigte, niedrig komplexe Proben beschränkt.

Der Durchbruch für die Analyse komplexer Proben wurde Ende der 1990er Jahre durch die Einführung der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) und deren Einbindung in einen sogenannten *Bottom-Up*

Ansatz erzielt (siehe Abbildung 1-4). Neben einem Übersichtsspektrum (MS^1 Spektrum), das die m/z der Peptide aufzeigt, werden bei der Tandem-Massenspektrometrie Fragmentationenspektren (MS^2 oder MS/MS Spektren) der Peptidfragmente erstellt. Mittels chromatographischer Trennung, die mit dem Massenspektrometer gekoppelt ist, auch als LC-MS Kopplung bezeichnet, können geringe Mengen an Proteinen (fmol Bereich) analysiert und quantifiziert werden (siehe Kapitel 1.3 und 1.4). Auch bei diesem Ansatz erfolgt die Identifizierung der Proteine über einen Abgleich mit einer Proteindatenbank [43].

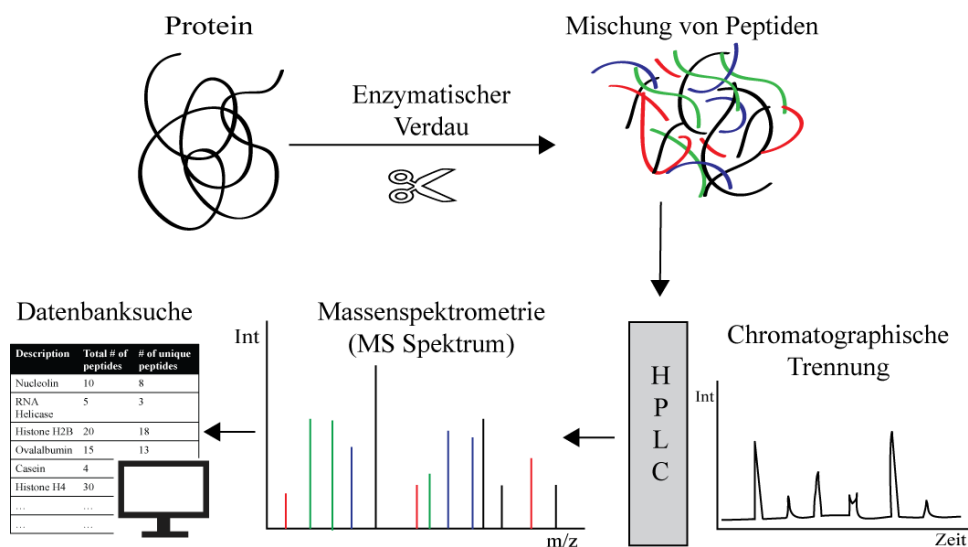


Abbildung 1-4: Ablauf einer klassischen Proteomanalyse nach der Bottom-up Strategie. Zunächst findet eine Aufreinigung der zu analysierenden Proteine statt, gefolgt von einem enzymatischen Verdau. Die generierten Peptide werden anschließend mittels Flüssigchromatographie getrennt und mittels Massenspektrometrie detektiert. Über MS^1 bzw. MS^2 Spektren kann eine spezifische Identifizierung der Proteine über einen Datenbankabgleich erfolgen.

Aufgrund der großen Datenmengen, die in LC-MS basierten proteomweiten Studien von komplexen Proben, sogenannten *large-scale* Experimenten, generiert werden, wurden Suchalgorithmen wie Sequest [44] und Mascot [45] entwickelt, die einen automatischen Abgleich der experimentellen Spektren mit den theoretischen Spektren in der Datenbank ermöglichen. Studien zur Analyse der Gesamtheit des Proteoms mittels biochemischer, meist LC-MS basierter Verfahren werden als Proteomik, engl. *Proteomics*, bezeichnet.

Für den enzymatischen Verdau im klassischen *Bottom-up* Ansatz wird standardmäßig die Protease Trypsin eingesetzt. Trypsin schneidet spezifisch C-terminal der Aminosäuren Arginin und Lysin. Lediglich beim Vorliegen von Prolin C-terminal dieser beiden Aminosäuren erfolgt keine Spaltung von Peptidsequenzen. Die generierten Peptide sind im Durchschnitt 14 Aminosäuren lang und besitzen am N-Terminus sowie an den Seitenketten des endständigen Lysins bzw. Arginins je eine positive Ladung

[46-47]. Hieraus ergibt sich bei Messungen im sauren pH-Bereich üblicherweise eine Nettoladung der tryptischen Peptide von +2, sodass Ladung und Größe mit den herkömmlichen MS Systemen und Parametern kompatibel sind. Der Ladungszustand hängt zudem von der Aminosäuresequenz ab, da geladene Seitenketten, z. B. in den Aminosäuren Histidin, Lysin oder Arginin, eine zusätzliche Ladung einbringen können.

Die Kontrolle der Reaktionsbedingungen, die Menge des Substrats sowie die Wahl des Trypsins (Hersteller, Spezifität) sind entscheidend für einen reproduzierbaren und vollständigen tryptischen Verdau [46]. Zudem beeinflussen Primär- und Sekundärstruktur sowie PTMs die Verdaueffizienz [48-49]. Im Jahr 2001 konnte von Lehmann *et al.* [49] am Beispiel der Proteinkinase A (PKA) gezeigt werden, dass durch eine Phosphorylierung in der Umgebung einer tryptischen Schnittstelle das Auftreten von überlesenen Schnittstellen verstärkt wird. Bei quantitativen Analysen führt ein unvollständiger und somit nicht reproduzierbarer Verdau zu über- bzw. unterrepräsentierten Peptidfragmenten, die die eigentliche Quantifizierung verfälschen. Eine verlässliche absolute Quantifizierung von Proteinabundanz sowie eine stöchiometrische Berechnung von Proteinkomplexen sind nur möglich, wenn die Verdaubedingungen für die jeweilige Probe optimiert wurden und kontrollierbar sind.

Neben Trypsin können auch weitere Proteasen wie Arg-C, Lys-N und Lys-C für den Verdau eingesetzt werden. Aufgrund ihrer Spezifität für nur eine Aminosäure generieren sie längere Peptidsequenzen, die mit Standardverfahren schlechter mittels LC-MS nachweisbar sind, jedoch Sequenzen abdecken können, die mit Trypsin aufgrund der Generierung zu kurzer oder zu langer Sequenzen nicht zugänglich wären. Während Lys-C und Arg-C eine hohe Spezifität aufweisen, besitzt Lys-N den Vorteil, dass es auch unter extremen Reaktionsbedingungen, wie erhöhter Temperatur sowie in denaturierenden Puffern (8 M Harnstoff oder 80 % Acetonitril) seine Aktivität beibehält [50].

Der Nachweis von substöchiometrisch vorliegenden Phosphorylierungen mittels LC-MS basierter Proteomanalyse wurde durch die Entwicklung einer Vielzahl an Anreicherungs- und Fraktionierungsmethoden erleichtert (siehe Kapitel 1.6). Wie auch die reine Proteomanalyse, hat die Phosphoproteomanalyse von der Entwicklung hochauflösender Massenspektrometer und mehrdimensionaler Fraktionierungsverfahren profitiert. Neben der Identifizierung der Phosphoproteine spielt die eindeutige Zuordnung einer Phosphorylierung zu einer bestimmten Aminosäure innerhalb einer Sequenz eine immer größere Rolle. Diesem Aspekt wurde durch die Entwicklung von Algorithmen zur Bewertung der Wahrscheinlichkeit der Lokalisierung einer Phosphorylierung innerhalb einer Peptidsequenz bzw. eines Proteins und ihrer Integration in die Datenauswertung Folge geleistet [51-52]. In neueren Studien aus dem Jahr 2014 konnten zwei unabhängige Forschergruppen erstmals mittels komplexer LC-MS Strategien, einschließlich Fraktionierungen, der Analyse von PTMS sowie eigens angepasster Datenanalyse, aus humanen Geweben, Zelllinien und Körperflüssigkeiten einen Katalog

des menschlichen Genoms erstellen, mit dem sie bis zu 90 % des gesamten menschlichen Proteoms, ~17.000 Proteine umfassend, abdecken konnten [53-54].

1.2.1. Die Proteomik in klinischen Fragestellungen

In den letzten Jahren hat die Proteomik Einzug in die klinische Forschung gehalten. Somit hat sich auch der Schwerpunkt der Forschung von beschreibenden, qualitativen Analysen hin zu differentiellen, quantitativen Studien verändert. Entscheidend ist hier die Dynamik des Proteoms und insbesondere des Phosphoproteoms beschreiben zu können, um Schlüsselkomponenten einer Erkrankung und ihren Einfluss auf die Progression der Erkrankung zu erkennen, bzw. sogenannte Biomarker zu detektieren. Herausforderungen stellen die eingeschränkte Verfügbarkeit von humanen Patientenproben sowie die enorme Heterogenität dar, die bereits bei Vergleichen des Proteoms von gesundem, aber insbesondere bei erkranktem Gewebe vorliegt. Vor allem im Hinblick auf eine Phosphoproteomanalyse ist die Probenmenge kritisch, da aufgrund der geringen Stöchiometrie der Phosphoproteine Anreicherungsschritte und aufwendige 2D-LC Verfahren notwendig sind, die oft zu einem erhöhten Bedarf an Probenmaterial von mehr als 1 mg Protein pro Patient führen. Daher wurden oft Krebszelllinien wie HeLa-Zellen für umfassende Studien des Phosphoproteoms verwendet, die in großen Mengen kultiviert werden können [55-56].

1.2.2. Chronische lymphatische Leukämie

Insbesondere bei Krebserkrankungen wird die Rolle von Phosphorylierungen bei Entstehung und Verlauf der Krankheit kontrovers diskutiert. Durch ihren großen Anwendungsbereich, der über globale *Discovery*-Studien bis zu zielgerichteten, *targeted* Ansätzen zur Überprüfung einzelner Proteine reicht, bietet sich die Proteomanalyse als Methode an, um Licht in diese Diskussionen zu bringen.

In dieser Arbeit wurde die chronische lymphatische Leukämie (CLL), eine Krebserkrankung von weißen Blutzellen, den B-Zellen, als Modellsystem gewählt. Biologisch gesehen erfolgt bei der CLL eine Proliferation von reifen, aber funktionslosen B-Zellen, die im Knochenmark, im Blut sowie in den sekundären Lymphorganen akkumulieren. Diese scheinbar reifen B-Zellen verdrängen die eigentlichen gesunden Zellen und führen so zu einer gestörten Immunabwehr der Patienten [57-58].

Die CLL tritt häufig erst in einem fortgeschrittenen Alter auf. Zwei Drittel der Patienten sind bei der Erstdiagnose älter als 60 Jahre. Die CLL stellt die häufigste Leukämieform in den westlichen Industrieländern dar, wobei Männer deutlich häufiger betroffen sind als Frauen [59]. Die Inzidenz liegt im Schnitt bei 3,8 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr [60].

Bei CLL-Patienten kann die Erkrankung einen extrem variablen klinischen Verlauf aufweisen, der von wenigen Monaten über mehrere Jahre bis zu Jahrzehnten variiert. Die Progression der Erkrankung kann in vielen Fällen anhand von prognostischen Markern vorausgesagt werden. Klinisch relevant ist der

Mutationsstatus der IgVH-Gene. Diese Gene kodieren für die variable Region der schweren Kette des Antikörpers, welcher einen Teil des B-Zellrezeptors darstellt. Liegt ein unmutierter IgVH-Genstatus (uIgVH) vor, spricht dies für eine aggressive Verlaufsform, ein mutierter Status (mIgVH) für eine mildere Form. Das durchschnittliche Überlebensalter für Patienten mit dem unmutierten CLL-Subtyp beträgt acht Jahre, das der Patienten mit mutiertem Status 25 Jahre [61]. Andere postulierte prognostische Marker sind das Expressionslevel der Tyrosinkinase ZAP-70 [62] sowie der Anteil an CD38+ (*cluster of differentiation 38*) B-Zellen. Jedoch scheint die Relevanz der CD38 Expression nicht abschließend geklärt zu sein [63-64].

Eine Behandlung der Erkrankung ist erst in einem fortgeschrittenen Stadium notwendig und kann in der Regel ambulant durchgeführt werden. Bei der Therapie von CLL-Patienten erfolgt die Auswahl der Medikamente anhand des genetischen Status der Patienten, des Blutbildes und der bestehenden Symptomatik. Die CLL ist nach derzeitigem Stand der Medizin nicht heilbar, jedoch kann eine Stammzelltransplantation erfolgen. Ihr Fortschreiten kann durch Chemotherapie und Antikörperbasierte Therapie sowie über die Gabe spezifischer Proteininhibitoren verlangsamt werden. Der Tyrosinkinaseinhibitor Ibrutinib (Handelsname Imbruvica) wurde 2014 für die Behandlung der CLL zugelassen und wird bereits als kommender sogenannter „Blockbuster“ mit einem jährlichen Umsatz von mehr als einer Milliarde US-Dollar gehandelt. Ibrutinib ist ein niedermolekularer Inhibitor der Bruton-Tyrosinkinase (BTK), der an Cys-481 im aktiven Zentrum der Kinase bindet. Diese Kinase ist Teil des B-Zellrezeptorsignalwegs (BCR-Signalwegs) und spielt somit eine zentrale Rolle für das Überleben, die Differenzierung und die Apoptose in B- und CLL-Zellen (siehe Abbildung 1-5) [65-67].

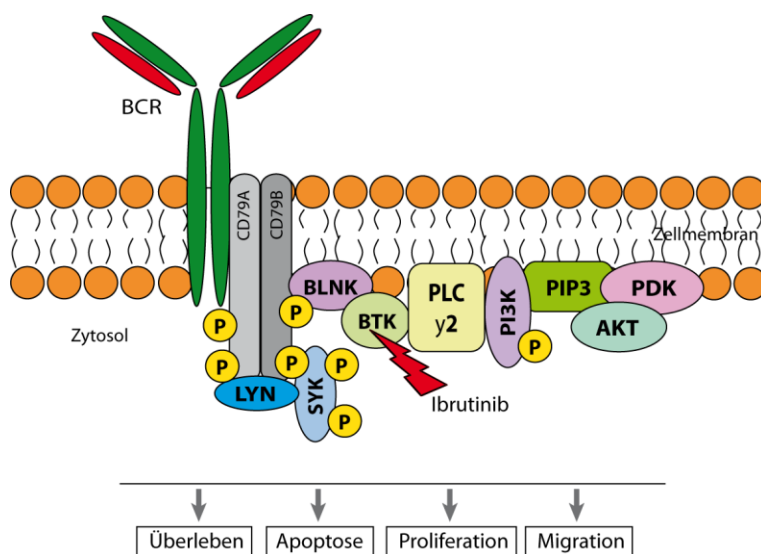


Abbildung 1-5: Der B-Zellrezeptorsignalweg als therapeutisches Ziel des BTK-Inhibitors Ibrutinib (modifiziert nach [68]). Eine Aktivierung des BCR führt zur Phosphorylierung der intrazellulären Domänen von CD79A/B durch die Tyrosinkinase LYN. Eine Weitergabe der Signalkaskade erfolgt anschließend u.a. über SYK (*spleen tyrosine kinase*), PI3K (*Phosphatidylinositol-3-Kinase*) und BTK, die überlebensfördernde und proliferative Signale induzieren.

Eine Aktivierung des BCR induziert überlebensfördernde Prozesse wie die PI3K- (Phosphatidylinositol-3-Kinase), NF- κ B- (*nuclear factor- κ B*) sowie MAPK- (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) Signalwege, die zu der Apoptoseresistenz der CLL-Zellen beitragen. Zudem scheint in CLL-Zellen eine verstärkte Aktivierung des BCR vorzuliegen und zur Pathogenese der CLL beizutragen, deren Ursprung noch nicht geklärt werden konnte [68-69]. An Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung der Mäuse mit Ibrutinib die Signalweiterleitung und somit die Proliferation der CLL-Zellen verändert [66]. In aktuellen klinischen Studien konnte zudem die Wirksamkeit von Ibrutinib auf die Gesamtlebensdauer von Patienten mit Rezidiv nachgewiesen werden [65, 69]. Die Ergebnisse der klinischen Studien der Phase 3 zur Wirksamkeit von Ibrutinib bei Erstbehandlung waren zum Zeitpunkt der Arbeit noch nicht abgeschlossen.

Bislang haben sich nur wenige globale Proteomstudien mit CLL-Zellen und einem Vergleich der CLL-Subtypen beschäftigt. Während in früheren Studien die Ergebnisse auf 2D-Gelelektrophorese in Kombination mit Massenspektrometrie beruhten und nur wenige Proteine identifiziert werden konnten [70-71], zeigen neuere Studien basierend auf LC-MS/MS Analysen ein umfassendes Proteinprofil mit mehr als 3000 Proteinen [72].

In einer Phosphoproteomstudie aus dem Jahr 2010 konnten nach vorheriger Stimulation der Zellen mit einem Chemokin 700 Phosphoproteine identifiziert werden [73]. Im Hinblick auf das Phosphoproteom von Krebszellen, wie HeLa-Zellen, in dem bereits 50.000 phosphorylierte Peptide nachgewiesen werden konnten [74], ist der Bedarf an einer Optimierung der Analysestrategie zu einer verbesserten Abdeckung des Phosphoproteoms von CLL-Zellen gegeben.

1.3. Grundlagen der Flüssigchromatographie

Zur Trennung der zu analysierenden Proben wurde die Flüssigchromatographie eingesetzt. Sie ist eine Trennmethode, bei der die in einer mobilen Phase gelösten Analyten über unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit einer stationären Phase aufgetrennt werden. Die Stärke dieser Wechselwirkung ist abhängig von den physikochemischen Eigenschaften der Analyten und bestimmt die Dauer der Retention auf der stationären Phase. Die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) wurde in den 1970er Jahren entwickelt und stetig im Hinblick auf ihre Leitungsfähigkeit verbessert [75]. Die hohe Leistungsfähigkeit basiert auf der Entwicklung von pulsationsarmen Pumpen, automatischen Injektionssystemen und Detektoren mit hohen Datenrate sowie widerstandsfähigen Säulen mit kleinen Partikeldurchmessern von $<10\ \mu\text{m}$, die schnelle Messungen bei hohen Drücken ($\geq 200\ \text{bar}$) ermöglichen.

Heutzutage dient die Umkehrphasen-Chromatographie (*reversed-phase*, RP) zu den wichtigsten Chromatographiemethoden im Bereich der Proteinanalytik. Für das RP-Verfahren werden unpolare, mit

n-Alkylresten (C18 oder C8) derivatisierte Kieselgele als stationäre Phase in Kombination mit einem polaren, wässrigen Lösungsmittel als mobile Phase verwendet. Die Zugabe von Ionenpaarreagenzien wie Trifluoressigsäure (TFA) zu der mobilen Phase erhöht die Hydrophobizität von polaren Probenmolekülen und somit ihre Affinität zu der stationären Phase. Die Elution der Analyten erfolgt durch den steigenden Anteil eines organischen Lösungsmittels, wie Acetonitril (ACN) oder Methanol, an der mobilen wässrigen Phase.

Ein Maß für die Effizienz der Trennung ist die Trennbodenhöhe H (auch als Theoretische Trennbodenhöhe HETP bezeichnet), die über die van Deemter-Gleichung (siehe Abbildung 1-6) beschrieben wird [76].

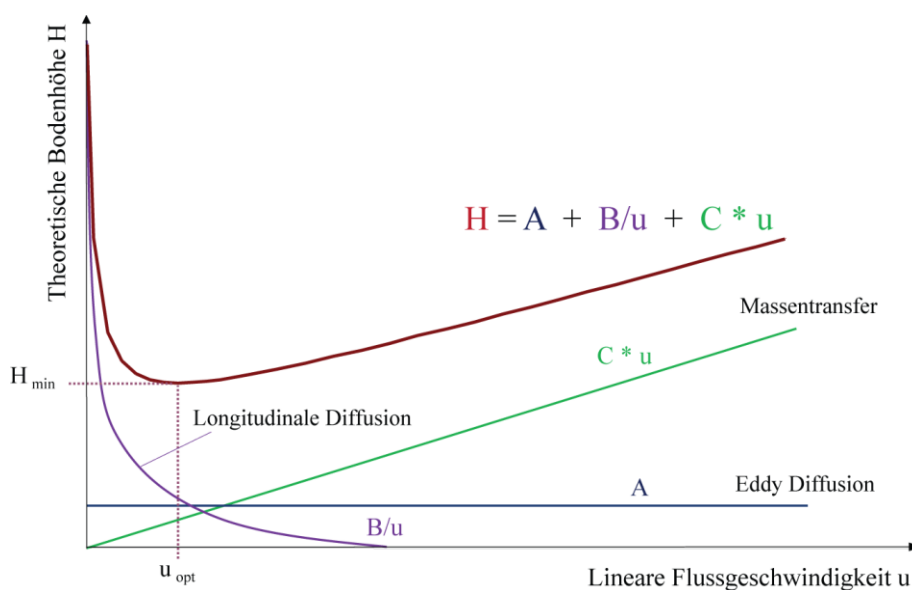


Abbildung 1-6: Die Terme der Van-Deemter Gleichung. Die Van-Deemter Gleichung gibt die Abhängigkeit der Trennleistung der Chromatographie von der linearen Flussgeschwindigkeit u unter Berücksichtigung von Diffusions- und Stoffaustauschphänomenen an. Sie ist beispielhaft für eine Säule mit $5 \mu\text{m}$ Partikeln dargestellt. H = Trennbodenhöhe, u = lineare Flussgeschwindigkeit, A = Eddy Diffusion, B = longitudinale Diffusion, C = Massentransfer

Hierbei wird die Trennbodenhöhe H durch drei Terme bestimmt: (I) Durch die Eddy Diffusion A , die unabhängig von der linearen Fließgeschwindigkeit u ist und die unterschiedlichen Wege der Probenmoleküle um die Partikel der Säule widerspiegelt, (II) die longitudinale Diffusion B , die die laminare Strömungsverteilung in der Säule in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit beschreibt sowie (III) den Massentransfer C , der den Stoffaustausch zwischen der mobilen und stationären Phase beschreibt (siehe Abbildung 1-6). Die Trennleistung einer chromatographischen Säule steigt bei einer Verringerung der Trennbodenhöhe H und somit über eine Erhöhung der Anzahl der theoretischen Trennböden N bei gleichbleibender Säulenlänge L (Gleichung 1).

$$H = \frac{N}{L} \quad (1)$$

Durch eine dichte Packung des Säulenmaterials, einer Verwendung von Partikeln mit einem Durchmesser $\leq 5 \mu\text{m}$, einer Verringerung des Durchmessers der Säulen hin zum μm -Bereich und der Anpassung der Flussrate an diese Dimensionen ($\leq 1 \mu\text{L}/\text{min}$) konnte die Trennleistung und Sensitivität der Flüssigchromatographie deutlich verbessert werden [77]. Die resultierenden kleinen Flüssigkeitsvolumina sowie die bei der RP-Chromatographie verwendeten Lösungsmittel ermöglichen die Kopplung von (nano-)HPLC und Massenspektrometrie mittels Elektrospray-Ionisation (ESI).

1.4. Massenspektrometrie in der Proteinanalytik

Die Einführung der Elektrospray-Ionisation durch John B. Fenn 1989 erlaubte die schonende Analyse großer sowie fragiler polarer Biomoleküle mittels Massenspektrometrie [78]. ESI stellt ein „sanftes“ Ionisationsverfahren dar, mit dem Analyten aus der flüssigen Phase ohne Fragmentierung in die Gasphase überführt werden können. Das Prinzip der ESI ist in Abbildung 1-7 schematisch dargestellt. Der exakte zugrundeliegende Mechanismus der Ionenbildung wird noch kontrovers diskutiert [79].

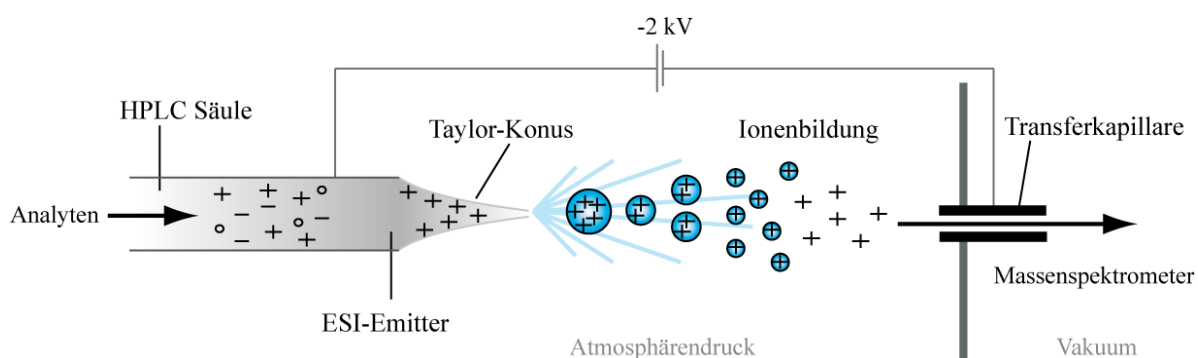


Abbildung 1-7: Schematische Darstellung der Elektrospray-Ionisation bei Atmosphärendruck. Das Anlegen einer Spannungsdifferenz bewegt geladene Ionen vom ESI-Emitter zum Massenspektrometer. Durch das Verdampfen des flüchtigen Lösungsmittels erhöht sich die Ladungsdichte innerhalb der Tropfen. Die zunehmende elektrostatische Abstoßung der Analyten führt zu sogenannten Coulomb-Explosionen, aus denen Analyt-Ionen hervorgehen, die in das Vakuum des Massenspektrometers gelangen.

Im Gegensatz zu den zu dieser Zeit vorherrschenden Ionisationsverfahren, wie MALDI [80-81] und *Fast atom bombardment* (FAB) [82], begünstigt ESI die Bildung mehrfach geladener Ionen. Die Mehrfachladung verringert das m/z -Verhältnis der Ionen und ermöglicht somit auch die Messung hochmolekularer Analyten in einem m/z -Bereich, der für viele Massenspektrometer detektierbar ist, typischerweise 50-2000 m/z . Zudem erlaubt die Kopplung von Flüssigchromatographie und ESI die kontinuierliche Analyse von komplexen Proben.

Neben der Ionenquelle sind ein Massenanalysator sowie ein Detektor die Hauptbestandteile eines Massenspektrometers. Das im MS generierte Spektrum enthält alle m/z der Molekülionen bzw. ihrer Fragmente, die zu einem bestimmten Zeitpunkt am Detektor aufgenommen werden.

1.4.1. Massenanalytoren und Fragmentierungsarten

Für die Proteinanalytik ist insbesondere die Wahl des Massenanalytators entscheidend, da sich die verschiedenen Analytoren anhand ihrer Sensitivität, ihres Auflösungsvermögens, ihrer Massengenauigkeit und ihrer Scan-Geschwindigkeit unterscheiden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden hauptsächlich Ionenfallen-Orbitrap und Quadrupol-Orbitrap Hybrid-Massenspektrometer verwendet, deren Besonderheiten im Folgenden erläutert werden.

1.4.1.1. LTQ Orbitrap Velos/ Orbitrap Elite

Das LTQ Orbitrap Velos bzw. Orbitrap Elite beinhaltet neben einer dualen, linearen Ionenfalle (LTQ) einen Orbitrap Massenanalysator [83]. Diese Kombination erlaubt die Aufnahme von hochaufgelösten Fragmentionenspektren in der Orbitrap sowie Spektren mit niedrigerer Auflösung in der LTQ. Übersichtsspektren werden grundsätzlich in der Orbitrap mit einer Massengenauigkeit <1 ppm aufgenommen, da eine genaue Bestimmung des m/z und der Ladung eines Peptids essentiell für eine verlässliche Datenbanksuche sind.

Niederaufgelöste MS/MS Spektren können parallel zu den Übersichtsspektren in der Ionenfalle akquiriert werden. Die Fragmentierung findet durch eine Vielzahl von niederenergetischen Stößen mit dem Inertgas Helium in dem Hochdruckbereich der Ionenfalle statt. Diese Fragmentierungsart wird als Ionenfallen-CID (*collision induced dissociation*) bezeichnet. Der Bruch der Aminosäureketten erfolgt an der Peptidbindung, da diese aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters eher starr und dadurch relativ labil ist. Bei dieser Fragmentierungsart entstehen, basierend auf der Nomenklatur nach Roepstorff und Fohlman [84], hauptsächlich b- und y-Ionen (siehe Abbildung 1-8).

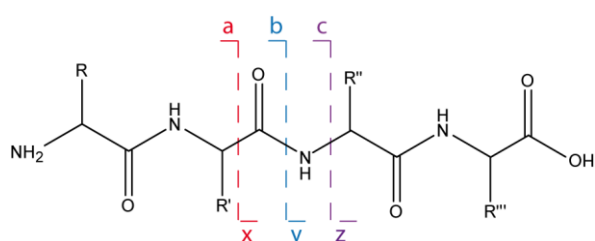


Abbildung 1-8: Nomenklatur von Fragmentionen nach Roepstorff und Fohlman (modifiziert nach [84]). Bei CID- und HCD-Fragmentierung treten hauptsächlich b- und y-Ionen (blau) auf, gelegentlich auch a- und x-Ionen (rot). ETD- (Elektronentransferdissoziation) Fragmentierung führt zur Generierung von c- und z-Ionen (lila). R = Aminosäurerest.

Die Fragmentionen werden in der Niederdruckkammer der LTQ detektiert. Diese bietet zwar eine geringere Auflösung als die Orbitrap, ist aber deutlich schneller und sensitiver, sodass parallel zu einem hochaufgelösten MS Scan 10 bis 15 MS/MS Spektren akquiriert werden können. Die parallele Detektion von Übersichts- und Fragmentionenspektren ermöglicht hohe Scan-Geschwindigkeiten. Ein Nachteil

von Ionenfallen ist jedoch, neben der geringen Auflösung, der auftretende Massenausschluss (*low mass cut-off*), der die Detektion von Peptidfragmenten, deren m/z kleiner als $1/3$ des m/z des Vorläuferions ist, ausschließt.

Grundsätzlich erfolgt die Aufnahme von hochaufgelösten MS/MS Spektren in der Orbitrap, nachdem die Peptide in der sogenannten HCD-Zelle, einem Oktapol, über das Inertgas Stickstoff fragmentiert wurden. Diese Fragmentierungsart wird mittels weniger, hochenergetischer Kollisionen ausgelöst und als *beam-type* CID oder *higher-energy collision dissociation* (HCD) bezeichnet [85]. Charakteristisch für die jeweilige Fragmentierungsart sind neben der Anzahl an Kollisionen auch die Art des Inertgases und des zu fragmentierenden Moleküls sowie das Zeitfenster der Aktivierung, die *Activation time* [86].

Im Hinblick auf die Analyse von Peptiden mit PTMs ist darauf hinzuweisen, dass relativ labile Bindungen, wie zum Beispiel die Phosphoesterbindung in Phosphopeptiden, bei Ionenfallen-CID vor der Peptidbindung brechen, sodass ein sogenannter Neutralverlust auftritt. Es kann, abhängig von der phosphorylierten Aminosäure, ein Verlust von 80 Da über die Abspaltung von HPO_3 , vor allem bei Tyr, oder ein Verlust von 98 Da über die Abspaltung von Phosphorsäure H_3PO_4 , vor allem bei Ser und Thr, erfolgen [87-88]. Das Neutralverlust-Ion ändert hierdurch seinen energetischen Zustand und kann nicht mehr angeregt werden. Die resultierenden Massenspektren weisen prominente Neutralverlustsignale auf und liefern oft nur unzureichende Strukturinformationen für modifizierte Peptide [89].

Zur Analyse von phosphorylierten Peptiden ist daher die Fragmentierung mittels HCD vorzuziehen. Zum einen ist der Verlust von Phosphorsäure weniger dominant als bei Ionenfallen-CID, zum anderen kann trotz eines Neutralverlusts eine weitere Fragmentierung des Neutralverlust-Ions erfolgen, sodass der Informationsgehalt des MS/MS Spektrums deutlich verbessert wird [90]. Zudem können mittels Fragmentierung in der HCD-Zelle niedermolekulare Verbindungen, wie die Reporterionen von stabil-Isotopen markierten Quantifizierungsreagenzien (siehe Kapitel 1.5.2) detektiert werden, die in der Ionenfalle aufgrund des *low mass cut-offs* verloren gehen.

1.4.1.2. QExactive

In der QExactive wird im Gegensatz zur LTQ Orbitrap Velos bzw. Orbitrap Elite ein Quadrupol als Massenfilter verwendet. Neben der Aufnahme von Übersichts- und Fragmentationenspektren nach HCD-Fragmentierung in der Orbitrap, ermöglicht dieser Aufbau des Massenspektrometers eine gezielte Auswahl von Vorläuferionen mit bestimmten m/z aus einer komplexen Probe mittels des Quadrupols sowie eine Detektion dieser Ionen bzw. ihrer Fragmente mit hoher Massengenauigkeit und Auflösung in der Orbitrap. Diese Art der Analyse wird auch als zielgerichteter Ansatz bzw. PRM (*parallel reaction monitoring*) bezeichnet. Die Sensitivität und der dynamische Bereich dieser Methode sind vergleichbar mit dem SRM (*selected reaction monitoring*) von Triple-Quadrupol-Massenspektrometern [91], allerdings bietet PRM den Vorteil der Hochauflösung.

Die optimierte Ionenweiterleitung (über einen *bent flatapole*) sorgt zudem für eine Umlenkung von Neutralteilchen, sodass auch bei einem hohen Durchsatz von humanen Proben, die oft eine starke Probenmatrix aufweisen, keine Verringerung der Signalintensitäten durch Aufladungen und Kontaminationen zu erwarten ist [92].

1.4.1.3. ETD als alternative Fragmentierungsart

Alternativ zu CID und HCD kann die Fragmentierung von Ionen mittels Elektronentransferdissoziation erfolgen. Hierbei reagiert das Peptidion mit einem Radikalanion (z. B. Fluoranthen), das ein Elektron auf das Peptid überträgt [93]. Im Gegensatz zu CID und HCD entstehen, unabhängig von der Aminosäuresequenz, durch einen Bruch der N-C α Atombindung hauptsächlich c- und z-Ionen (siehe Abbildung 1-8). Da es sich bei ETD um eine milde Anregungsart handelt, bleiben Peptidmodifikationen grundsätzlich erhalten, wodurch ETD insbesondere für die Phosphopeptidanalytik von Interesse ist.

Eine optimale Fragmentierungseffizienz und somit eine vollständige Sequenzabdeckung wird bei ETD jedoch nur bei hoch geladenen Analyten, die mehr als zwei positive Ladungen tragen, erreicht. Um die Länge und damit die Nettoladung der Peptide zu erhöhen, sollte anstelle von Trypsin eine Protease mit einer Spezifität für lediglich eine Aminosäure, wie Glu-C, Lys-N oder Lys-C, gewählt werden [94].

Kritisch ist zudem die relativ lange Reaktionszeit zwischen Peptid und Radikalanion zu sehen, die zu einer verlängerten Zykluszeit (*Cycle time*) und somit zu einer geringen Identifikationsrate bei hoch komplexen Proben führen kann [95].

1.4.2. Datenanalyse

Aufgrund der enormen Datenmengen, die aus LC-MS basierten proteomischen Ansätzen generiert werden, ist eine verlässliche Annotation der Phosphorylierungsstellen und Identifikation der zugehörigen Peptidsequenzen von enormer Bedeutung. Mascot [45] und Sequest [44] sind gängige Suchalgorithmen für die Identifikation von Proteinen anhand eines Abgleichs von MS/MS Spektren und organismenspezifischen Proteindatenbanken. Sie können allerdings auch zu falsch positiven Identifikationen führen. Deshalb wird für die Bewertung der Spektrenidentifikationen in großen Datensätzen die sogenannte *false discovery rate* (Falsch-positive Identifikationsrate, FDR) verwendet [96]. Hierbei werden *decoy*-Sequenzen erstellt, die nicht in der Natur vorkommen, und in einer Datenbank mit den eigentlichen Sequenzen, den *target*-Sequenzen, vereint, sodass eine sogenannte *target-decoy*-Datenbank entsteht. Die *decoy*-Daten können z. B. durch eine Umkehrung oder zufällige Varianten der Proteinsequenzen generiert werden. Die Anzahl der *decoy*-Hits gilt hier als Maß für die Anzahl an Zufallstreffern in der *target*-Datenbank. Die Berechnung der FDR erfolgt aus der Anzahl der Treffer in der *decoy*-Datenbank geteilt durch die Summe der Treffer in *target*- und *decoy*-Datenbank, wobei ein Treffer in der *target*-Datenbank mit der gleichen Wahrscheinlichkeit wie in der *decoy*-

Datenbank auftreten kann. Bei der Datenauswertung von massenspektrometrischen Analysen wird üblicherweise eine FDR von $\leq 1\%$ als Filterkriterium angesetzt [97].

Neben der Peptidsequenz kann bei PTMs allerdings auch die Position der PTM falsch zugeordnet sein. Hilfe bei der korrekten Lokalisierung von Phosphorylierungen bieten verschiedene Algorithmen, wie z. B. der *Mascot Delta-Score (MD Score)* [51] oder phosphoRS [52]. Der *MD Score* stellt eine relativ simple und dennoch verlässliche Methode für die Lokalisierung von Phosphorylierungsstellen dar, die auf der Differenz der *Mascot Ion Scores* des besten und zweitbesten Treffers des Suchalgorithmus Mascot mit der zugrundeliegenden Datenbank beruht. Wenn beide Treffer die gleiche Aminosäuresequenz mit unterschiedlichen Positionen der PTM repräsentieren, dann entsprechen hohe *Delta Scores* einer hohen Wahrscheinlichkeit, dass der erste Treffer korrekt ist.

PhosphoRS berechnet die Wahrscheinlichkeit, dass der erhaltene Treffer ein Zufallstreffer ist. Hierbei erfolgt der Vergleich zwischen den theoretischen Fragmentationen der Datenbank, basierend auf allen möglichen Isoformen des Peptids, und den detektierten Fragmentationen. Das MS/MS Spektrum wird hierzu in Fenster von je 100 m/z unterteilt. Eine Besonderheit von phosphoRS ist, dass die Anzahl der extrahierten Signale pro Fenster variabel ist und die Berechnung des Scores unter Berücksichtigung der Fragmentierungsmethode sowie der Genauigkeit des Massenanalysators erfolgt. Der ausgegebene phosphoRS-Wert gibt schließlich die Wahrscheinlichkeiten der Lokalisierung der Phosphorylierung an einer bestimmten Aminosäure der identifizierten Peptidsequenz in Prozent an [52].

1.5. Strategien der quantitativen Proteomanalyse

Im Allgemeinen erfolgt in Proteomanalysen eine Bestimmung von Analytmengen und -konzentrationen über einen relativen Vergleich, eine sogenannte relative Quantifizierung. Hierbei werden die Verhältnisse von Analyten dargestellt und keine quantitativen Ergebnisse generiert.

Eine absolute Quantifizierung ist über die Verwendung eines internen Standards möglich, erfordert jedoch einen höheren Aufwand im Hinblick auf Zeit und Kosten. Als interner Standard können z. B. stabil-Isotopen markierte Peptide verwendet werden, die individuell für das zu quantifizierende Peptid bzw. Protein synthetisiert und in bekannten Mengen zu der Probe hinzugefügt werden müssen. Insbesondere im Hinblick auf eine zielgerichtete MS/MS Strategie findet dieser Ansatz zunehmend Verwendung.

Die Angleichung der Probenmengen basierend auf biochemischen Assays, Aminosäureanalyse oder photometrischen Messungen ist entscheidend für eine verlässliche und präzise Quantifizierung des Proteoms [98]. Im Folgenden werden gängige Ansätze zur markierungsfreien und stabil-Isotopen markierten Quantifizierung näher erläutert.

1.5.1. Markierungsfreie Quantifizierung

Eine gängige Variante der markierungsfreien Quantifizierung beruht auf dem Vergleich der Anzahl an identifizierten MS/MS Spektren (*spectral counting*) eines Peptids zwischen verschiedenen Proben. Diese Anzahl an Spektren, die mittels Proteindatenbanksuche ermittelt wurden, dient als Maß für die Abundanz dieses Peptids bzw. Proteins in einer Probe [99].

Neben *spectral counting* kann eine Quantifizierung auch über die Intensität bzw. anhand der Fläche des Analytens erfolgen, wenn eine Zuordnung gleicher Peptidionen über charakteristische Eigenschaften wie m/z , Ladung, Retentionszeit und Isotopenmuster zwischen verschiedenen Proben möglich ist. Die Intensitäten bzw. Flächen der Peptidionen können mittels unterschiedlicher Software, z. B. Progenesis von Nonlinear Dynamic oder Proteome Discoverer, bestimmt und zu einer relativen Quantifizierung herangezogen werden.

In dieser Arbeit wurde lediglich die datenabhängige Akquisition (*data-dependent acquisition*, DDA) eingesetzt, bei der anhand eines Übersichtsspektrums die intensivsten Signale (Top N) für Fragmentationsspektren ausgewählt werden. Besonders im Hinblick auf eine markierungsfreie Quantifizierung stellt die datenunabhängige Akquisition (*data-independent acquisition*, DIA) eine Alternative dar. Bei der DIA wird der Massenbereich in m/z -Fenster definierter Breite, z.B. 10 m/z , unterteilt und die vorhandenen Signale unabhängig von ihrer Intensität parallel selektiert und fragmentiert [100-101]. Vorteile der DIA sind die hohe Sensitivität und die Detektion koeluierender Analyten, jedoch sind die Fragmentationsspektren sehr komplex, sodass die Auswertung der Daten immer noch eine Herausforderung darstellt.

Voraussetzung für die Anwendbarkeit von markierungsfreien Ansätzen ist neben einem hochauflösenden Massenspektrometer eine hohe Reproduzierbarkeit der LC-MS Analysen hinsichtlich Signalintensitäten und Retentionszeiten. Sind diese Voraussetzungen gegeben, können markierungsfreie Verfahren für einen Vergleich von differentiellen Proben verwendet werden. Hierbei werden die Proben unabhängig voneinander aufbereitet und mittels LC-MS separat analysiert.

Bei hoch komplexen Proben führen zusätzliche Schritte in der Probenaufarbeitung, wie eine Fraktionierung und/oder Anreicherung von Phosphopeptiden, jedoch oft zu Varianzen und geringer Reproduzierbarkeit, die die Anwendbarkeit der markierungsfreien Quantifizierung bei der Beantwortung klinisch relevanter Fragestellungen einschränken. Zudem entstehen durch die notwendigen Einzelmessungen der Proben hohe apparative Kosten, die die Kosten der chemischen Reagenzien übersteigen können und somit die eigentliche Attraktivität dieser Strategie mindern.

1.5.2. Quantifizierung mittels Stabil-Isotopenmarkierung

Die Quantifizierung mittels stabilen Isotopen kann durch chemische oder metabolische Markierung erfolgen. Jeweils ein gängiges Verfahren dieser Strategien wird nachfolgend beschrieben.

Bei der metabolischen Markierung nach dem SILAC- (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) Verfahren, werden stabil-Isotopen markierte Aminosäuren eingesetzt, die in das Zellkulturmedium oder der Nahrung von Versuchstieren hinzugefügt werden. Bei proteomischen Ansätzen werden hierzu häufig Lysin und Arginin, die ^{13}C und ^{15}N Atome anstatt ^{12}C und ^{14}N enthalten, verwendet, die aufgrund des meist tryptischen Verdaus in nahezu jedem Peptid vorhanden sein sollten. Der Einbau der stabil-Isotopen markierten Aminosäuren während der Proteinbiosynthese kann anhand des auftretenden Massenshifts mittels Massenspektrometrie detektiert werden. Bei der Vergleichsprobe erfolgt keine Markierung.

Ein Nachteil dieses Verfahrens ist das Auftreten von Duplettsignalen in MS^1 Spektren, da nach Vereinigung der zu vergleichenden Proben sowohl „leichte“ als auch „schwere“ Peptide vorliegen (entsprechend Triplettsignale bei drei Ansätzen), sodass die Komplexität der Probe stark erhöht wird.

Das SILAC-Verfahren wurde in den letzten Jahren so modifiziert, dass es auch zur differentiellen Analyse von humanem Gewebe eingesetzt werden kann und nicht länger auf die Proliferation von Zellen in Zellkultur beschränkt ist. Hierzu erfolgte eine metabolische Markierung von fünf Krebszelllinien, die anschließend vereint als interner, repräsentativer Standard in Proben von Patienten mit Brustkrebs dienten. Dieser Standard wurde jeder Probe hinzugefügt und zur relativen Quantifizierung herangezogen, sodass keine Markierung des eigentlichen Zellmaterials erfolgen musste. Das Verfahren wird als Super-SILAC bezeichnet [102].

In dieser Arbeit wurde zur chemischen Markierung von Peptiden das iTRAQ- (*isobaric tag for relative and absolute quantitation*) Verfahren eingesetzt. Es beruht auf einer Reaktion von Peptiden mit isobaren, stabil-Isotopen markierten Reagenzien [103]. Andere gängige chemische Label sind Dimethyl-Markierungen [104] sowie ICPL (*isotope-coded protein label*) [105].

Die Derivatisierung der Peptide mittels iTRAQ-Reagenzien erfolgt an primären Aminenen, die im Proteom an freien N-Termini oder an Lysinresten vorkommen. Jede zu vergleichende biologische Probe wird mit einem anderen iTRAQ-Reagenz markiert (siehe Abbildung 1-9, bis zu 4 Varianten im 4-plex Kit sowie bis zu 8 Varianten im 8-plex Kit).

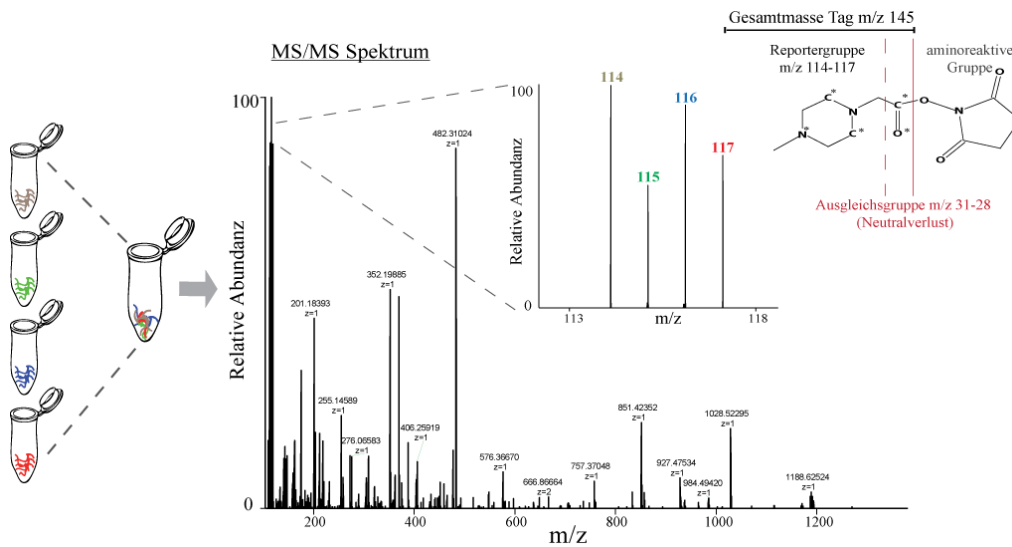


Abbildung 1-9: Schematische Darstellung der iTRAQ-Markierung zur Quantifizierung von Peptiden in bis zu vier biologischen Proben (4-plex Ansatz). Da es sich um isobare Tags handelt, erfolgt kein Massenshift in den Vorläuferionenspektren (MS^1). Die Quantifizierung findet auf Ebene der MS/MS Spektren statt, basierend auf der Signalintensität der vier Reporterionen, die die relativen Mengen des entsprechenden Peptids in den Proben repräsentieren. Chemisch besteht das Reagenz aus drei Teilen, die eine Gesamtmasse von 145 m/z besitzen.

Die isobaren Reagenzien bestehen jeweils aus drei Komponenten: einer Reportergruppe, einer Massenausgleichsgruppe und einer aminoreaktiven Gruppe (N-Hydroxysuccinimid-Ester). Sie unterscheiden sich lediglich in der Kombination der schweren Isotope ^{15}N , ^{13}C und ^{17}O . Durch die Ausgleichsgruppe tritt kein Massenshift bei einer Messung der Vorläuferionen in MS^1 Spektren auf, sodass die Komplexität der Probe anders als bei SILAC nicht erhöht wird. Erst durch eine Fragmentierung der Peptide im Massenspektrometer erfolgt die Abspaltung der geladenen Reporter: im Falle des 4-plex Kits entstehen Reporterionen mit 114, 115, 116 und 117 Da. Die Quantifizierung wird in den MS^2 Spektren über die Signalintensitäten der Reporterionen durchgeführt. Anders als bei der metabolischen Markierung erfolgt die Markierung der Proben mit den unterschiedlichen Reagenzien erst nach dem enzymatischen Verdau, sodass Unterschiede in der Probenaufarbeitung, etwa bei der Lyse der Zellen oder während des Verdau, die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Ergebnisses stark beeinflussen können.

Sowohl SILAC- als auch iTRAQ-basierte Strategien haben in Phosphoproteomanalysen den Vorteil, dass die differentiellen Proben vor der Anreicherung der Phosphopeptide zu einer Probe vereint werden und sich somit systematische Fehler auf alle Proben gleich auswirken. Durch die Vereinigung der Proben spielen apparative Einflüsse, wie instabiles Spray oder schwankende Retentionszeiten, bei der LC-MS Analyse eine weitaus geringere Rolle als bei markierungsfreien Ansätzen.

1.6. Anreicherungsstrategien für Phosphopeptide

Eine Anreicherung von Phosphopeptiden aus stabil-Isotopen markierten und markierungsfreien Proben ist mit unterschiedlichsten Strategien möglich, von denen im Folgenden die in dieser Arbeit verwendeten Techniken näher beschrieben werden.

Da diese Strategien ursprünglich für die Anreicherung von O-Phosphorylierungen entwickelt wurden und nur eingeschränkt auf N-Phosphorylierungen übertragen werden können, wird ihre Anwendbarkeit für die Detektion von Phosphohistidin in Kapitel 1.6.3 getrennt diskutiert.

1.6.1. Titandioxid-basierte Anreicherung

Metallionen-basierte Verfahren wie IMAC (Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie) und Metalldioxid-basierte Verfahren wie Titandioxid (TiO_2) gehören zu den aktuell gängigsten Techniken zur Anreicherung von Phosphopeptiden aus komplexen Proben. Bereits 1990 konnte die hohe Affinität von Metalloxiden gegenüber organischen Phosphaten nachgewiesen werden [106].

Im Vergleich zu Metallionen-basierten Verfahren ist die Metalldioxid-basierte Anreicherung relativ robust gegenüber Salzen und Detergenzien und ist damit optimal für die Anreicherung von Phosphopeptiden aus Zelllysaten geeignet [107]. Die Selektivität dieses Verfahrens kann durch die Bindung von Peptiden mit den sauren Aminosäuren Glutamat und/oder Aspartat, die neben den phosphorylierten Peptiden unspezifisch an die Oberfläche der Titandioxidpartikel binden, beeinträchtigt werden [108]. Jedoch konnte von Larsen *et al.* [109] gezeigt werden, dass die Zugabe von Säuren wie Dihydroxybenzoesäure (DHB) zum Ladepuffer diese unspezifischen Interaktionen verringert. In dem publizierten Protokoll erfolgte eine *offline* Anreicherung über Titandioxidpartikel in Filterspitzen, die aus Pipettenspitzen, hydrophobem porösem C8 Material als Fritte sowie den Titandioxidpartikeln selbst gepackt werden müssen. Nach mehreren Waschschritten zur Entfernung weiterer unspezifisch gebundener Peptide wurden die an die Titandioxidpartikel gebundenen Phosphopeptide über basische Elutionspuffer, $\geq \text{pH } 10,5$, eluiert. DHB wird in aktuelleren Protokollen zunehmend durch Glykolsäure oder Milchsäure ersetzt, da DHB nicht vollständig in den Entsalzungsschritten entfernt werden kann und so zu Problemen bei LC-MS Analysen führt.

Durch die hohe Affinität der Phosphatgruppen gegenüber Titandioxid können mehrfach phosphorylierte Peptide nur schlecht von den Partikeln eluiert werden. Um sowohl einfach als auch mehrfach phosphorylierte Peptide in einem Ansatz anreichern zu können, wurde das SIMAC-Verfahren (*sequential elution from IMAC*) entwickelt [110]. Zunächst wird hierzu eine IMAC-Anreicherung durchgeführt, bei der im ersten Elutionsschritt die einfach phosphorylierten Peptide unter sauren Bedingungen eluiert werden und im zweiten Schritt die Elution der mehrfach phosphorylierten Peptide unter basischen Bedingungen erfolgt. Das saure Eluat sowie die ungebundenen Peptide werden

anschließend mittels Titandioxid nochmals angereicht, um die Ausbeute an einfach phosphorylierten Peptiden zu erhöhen.

1.6.2. Chromatographische Anreicherungsverfahren

Die folgenden chromatographischen Verfahren können zur Verringerung der Komplexität von biologischen Proben nach Titandioxidanreicherung, aber auch zu einer direkten Anreicherung von phosphorylierten Analyten eingesetzt werden. Durch ihre speziellen Separationseigenschaften und ihre Orthogonalität zu der üblichen Umkehrphasen-Chromatographie ermöglichen sie tiefere Einblicke in das Proteom.

1.6.2.1. Kationenaustausch-Chromatographie

Die Spezifität der Kationenaustausch-Chromatographie (*cation exchange chromatography*, CX) beruht auf einer negativ geladenen stationären Phase, z. B. aus Polysulfoethyl A, die positiv geladene Analyten aus der mobilen Phase anzieht. Die Elution der Analyten kann über eine Erhöhung der Salzkonzentration oder über eine Änderung des pH-Wertes in der mobilen Phase erfolgen [111].

Die starke Kationenaustausch- (*strong cation exchange*, SCX) Chromatographie wurde für die Anreicherung und Fraktionierung von modifizierten Peptiden, insbesondere für phosphorylierte [112] und acetylierte Peptide [113], optimiert. Starke Kationenaustauscher behalten ihre negative Ladung auch unter sauren Bedingungen bei. Für eine selektive Anreicherung phosphorylierter Peptide kann ausgenutzt werden, dass sie gegenüber unmodifizierten tryptischen Peptide bei einem sauren pH-Wert der SCX-Puffer (z. B. pH ~2,7 [56]) eine negativ geladene Phosphatgruppe aufweisen und somit eine veränderte Retention zeigen. Die negative Ladung der Phosphatgruppe und die negativ geladenen Ketten der stationären Phase stoßen sich gegenseitig ab, sodass phosphorylierte Peptide zu Beginn der Auftrennung, ggf. im Bereich des Totvolumens, eluieren (siehe Abbildung 1-10).

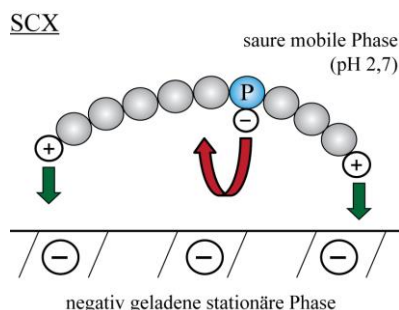


Abbildung 1-10: Schematische Darstellung der Interaktion eines phosphorylierten tryptischen Peptids in SCX. Negative Ladungen wie die der Phosphatgruppe führen zu einer Abstoßung von der stationären Phase, während die positiven Ladungen am N-Terminus sowie in den Seitenketten eines tryptischen Peptids (pH 2,7) eine hohe Affinität zur negativ geladenen stationären Phase aufweisen.

Aufgrund der meist salzhaltigen Puffer ist SCX im Allgemeinen nicht direkt mit MS kompatibel, sodass Entsalzungsschritte vorgeschaltet werden müssen.

1.6.2.2. Hydrophile Interaktionschromatographie

Das HILIC- (Hydrophile Interaktionschromatographie) Verfahren wird typischerweise für die Analyse kleiner, polarer Komponenten, wie Zucker, eingesetzt, die nicht bzw. schlecht an RP-Material binden [114]. Die Ausbildung einer wässrigen Schicht auf der polaren stationären Phase ermöglicht die Retardierung von polaren Analyten, die sich in einer hoch-organischen mobilen Phase befinden. Diese Interaktion kann in einer Gradientenelution durch einen steigenden wässrigen Anteil in der mobilen Phase aufgelöst werden. Durch ihre höhere Polarität eluieren phosphorylierte Peptide später als unmodifizierte tryptische Peptide, da sie eine höhere Affinität zur wässrigen Schicht auf der stationären Phase aufweisen (siehe Abbildung 1-11).

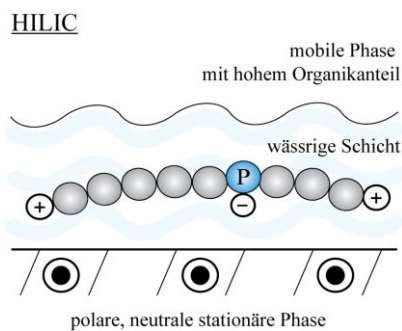


Abbildung 1-11: Schematische Darstellung der Interaktion eines phosphorylierten tryptischen Peptids in HILIC. Das polare phosphorylierte Peptid besitzt eine hohe Affinität zur der in HILIC ausgebildeten wässrigen Schicht. Dargestellt ist eine underivatisierte stationäre Phase.

Als stationäre Phasen finden sowohl underivatisierte als auch derivatisierte Silica-Phasen (z. B. zwitterionische Säulen) Anwendung, sodass neben einer Verteilungschromatographie auch elektrostatische Interaktionen, abhängig vom Säulentyp, eine Rolle spielen können [115].

Die Kompatibilität der HILIC-Puffer, wie etwa Ammoniumformiat oder -acetat als wässrigem Anteil, haben zu einer großen Beliebtheit von HILIC in proteomischen LC-MS basierten Experimenten geführt, da lediglich eine Trocknung der aufgetrennten Proben statt aufwendiger Entsalzungsschritte, wie z. B. nach einer SCX-Auftrennung, durchgeführt werden muss.

HILIC stellt weniger eine reine Anreicherungsmethode als eine Fraktionierungstechnik von bereits angereicherten Proben dar. Eine Kombination von TiO_2 , SIMAC und HILIC, abgekürzt als TiSH-Verfahren, konnte erfolgreich für die Anreicherung von 22 Phosphopeptiden pro μg Protein aus insulinproduzierenden Tumorzellen eingesetzt werden [116].

1.6.2.3. Electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography

Die *Electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography* (ERLIC) nutzt sowohl elektrostatische Interaktionen als auch Verteilungseffekte, die durch die Ausbildung einer wässrigen polaren Schicht auf der stationären Phase möglich werden, für die chromatographische Trennung. Hierzu wird ein schwacher Anionenaustauscher mit einer HILIC ähnlichen mobilen Phase bei saurem pH-Wert kombiniert [117]. Beide Mechanismen führen dazu, dass die partiell negativ geladenen und relativ polaren Phosphopeptide auf der stationären Phase stärker retardiert werden als nicht modifizierte Peptide, die aufgrund ihrer positiven Nettoladung (partiell positiv am N-Terminus, Arg bzw. Lys oder His) abgestoßen werden (siehe Abbildung 1-12). Eine Elution kann über die Erhöhung des Salz- oder Wassergehalts in der mobilen Phase erfolgen [117].

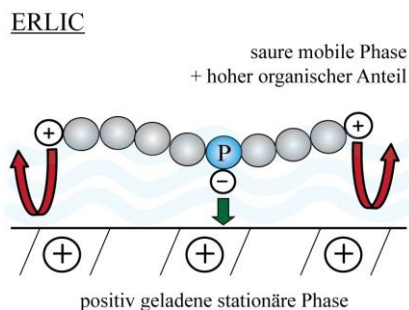


Abbildung 1-12: Schematische Darstellung der Interaktion eines phosphorylierten tryptischen Peptids in ERLIC. Das polare phosphorylierte Peptid besitzt eine hohe Affinität zur der ausgebildeten wässrigen Schicht sowie, aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppe, zu der positiv geladenen stationären Phase.

Neben SCX stellt ERLIC ein sensitives Verfahren für die direkte Anreicherung von Phosphopeptiden aus komplexen Proben dar [118-119]. Ein Nachteil dieses Verfahrens sind jedoch die verwendeten salzhaltigen Pufferkomponenten, wie Methylphosphonsäure und Triethylammoniumphosphat (TEAP), die nicht mit MS kompatibel sind und nur unzureichend mittels Festphasenextraktion entfernt werden können, sodass die chromatographische Auflösung trotz Aufreinigung der Proben beeinträchtigt wird.

1.6.3. Anreicherungsstrategien von Phosphohistidin

Die Anwendbarkeit der beschriebenen Verfahren für die Anreicherung von pHis ist aufgrund der verwendeten sauren Inkubations- und Waschschriffe sowie der chromatographischen Auftrennungen in stark sauren Puffern massiv eingeschränkt. Während der Probenaufarbeitung und in den Anreicherungs-schritten ist zunächst eine Konservierung der Phosphoamidatbindung entscheidend, sodass im Allgemeinen neutrale oder basische Lösungsmittel eingesetzt werden [32]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei der LC-MS Analyse einzelner synthetischer pHis-Peptide und -Proteine auch eine relativ kurze chromatographische Trennung, von ~30 min, unter sauren Bedingungen, z. B. in 0,1 % TFA, auf C18-Säulen erfolgen kann [120-121].

Napper *et al.* [122] konnten mittels eines Cu^{2+} -IMAC Verfahrens eine Anreicherung von pHis-Peptiden nachweisen. In diesem Ansatz wurde das Protein HPr (*Histidine-containing protein*) aus *E. coli* extrahiert und *in vitro* phosphoryliert. Nach einem enzymatischen Verdau konnte mittels MALDI-TOF Analyse im negativen Ionisationsmodus die erwartete pHis-Sequenz anhand des m/z in MS^1 detektiert werden. Da es sich in diesem Verfahren um den Nachweis aus einer niedrig komplexen Probe mit einer hohen Konzentration des Analyten handelt, muss die Anwendbarkeit dieses Ansatzes für den Nachweis endogener Phosphorylierungen noch evaluiert werden. Bislang ist in der Literatur keine weitere erfolgreiche Anwendung von Metallionen bzw. Metalloxiden zur Anreicherung von pHis aufgeführt.

Die bislang erfolgreichsten Ansätze zur Anreicherung von Phosphohistidin aus komplexen Proben erfolgten mittels anti-pHis Antikörpern [30, 37, 123]. Aufgrund der Instabilität der Phosphoamidatbindung wurden verschiedene stabile pHis-Analogs zur Antikörperherstellung verwendet.

Oslund *et al.* [30] gelang der Nachweis von 15 endogenen Phosphorylierungen an Histidin in *E. coli*. Wie bereits in einer vorausgehenden Studie dieser Arbeitsgruppe wurde ein polyklonaler anti-pHis Antikörper eingesetzt, der auf Basis des stabilen pHis-Analogons pTze (Phosphoryl-Triazolylethylamin) hergestellt wurde. Die Anreicherung von pHis erfolgte über eine Immunpräzipitation von pHis-Proteinen aus *E. coli* Lysat mit anschließendem tryptischen Verdau und LC-MS/MS Analyse der angereicherten Peptide. Trotz eines Einsatzes von mehreren Milligramm Zelllysate als Startmaterial konnten keine niedrig abundanten pHis-Proteine, wie pHis-Kinasen, nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde in dieser Arbeitsgruppe eine zweite Generation eines anti-pHis Antikörpers generiert, der auf dem pHis-Analogen pPye (Phosphono-Pyrazolylethylamin) basiert, welches strukturell stärker pHis ähnelt [124]. In Western Blots und ELISA konnten bereits eine höhere Affinität und Spezifität dieses Antikörpers zu pHis gegenüber der ersten Generation des anti-pHis Antikörpers nachgewiesen werden, was auch auf eine geringe Kreuzreaktivität zu pTyr zurückzuführen ist.

Eine aktuelle Studie über die Generierung und Anwendung von monoklonalen Antikörper gegen 1-pHis bzw. 3-pHis durch Fuhs *et al.* [37] ermöglichte erste umfassendere Einblicke in das pHis-Proteom von humanen Zellen mittels Immunfluoreszenzanalysen. Die Generierung der Antikörper erfolgte über Peptidbibliotheken, die 1-pTza (1-Phosphoryl-Triazolylalanin) bzw. 3-pTza (3-Phosphoryl-Triazolylalanin) als pHis-Analogen enthielten. Zudem wurden die monoklonalen Antikörper immobilisiert und für eine Immunaффinitätschromatographie-basierte Anreicherung von zwei *in vitro* phosphorylierten Proteinen sowie HEK293-Zellen, mit anschließendem tryptischen Verdau und LC-MS/MS Analyse herangezogen.

Gelbasierte [120] oder chromatographische Ansätze zur Anreicherung von pHis aus Zelllysaten ohne spezifische anti-pHis Antikörper konnten bislang nicht erfolgreich etabliert werden.

2. Zielsetzung

Die LC-MS basierte Proteomanalyse stellt eine relativ neue analytische Strategie dar, die zum besseren Verständnis von molekularen Zusammenhängen beitragen kann. Posttranslationale Modifikationen (PTMs) erweisen sich hierbei als besondere Herausforderung, da ihre Wechselwirkungen sehr komplex sind, sie oft nur für eine kurze Zeitdauer auftreten und eine geringe Abundanz aufweisen. Die wohl abundanteste dieser PTMs ist die Phosphorylierung. Im Rahmen dieser Arbeit sollten aktuelle Herausforderungen der heutigen Phosphoproteomanalyse aufgegriffen und neue Ansätze zur Lösung dieser Problemstellungen erarbeitet und evaluiert werden:

Eine dieser Herausforderungen ist die limitierte Verfügbarkeit und hohe Heterogenität von medizinisch relevanten Proben wie Immunzellen. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, ein sensitives und robustes Protokoll für die Probenvorbereitung und Anreicherung von sogenannten O-phosphorylierten Peptidsequenzen aus komplexen Zelllysaten zu etablieren, um die benötigte Probenmenge für eine quantitative Proteomanalyse zu reduzieren sowie eine statistische Datenauswertung zum Nachweis biologisch relevanter Prozesse zu integrieren. Für einen *Proof-of-Principle* Ansatz wurden Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) untersucht, deren entartete B-Zellen eine Apoptoseresistenz aufweisen und im peripheren Blut akkumulieren. Da dem B-Zellrezeptor sowie einer hierdurch induzierten verstärkten Aktivierung weiterer überlebensfördernder Signalwege eine entscheidende Rolle in der Progression der Erkrankung zugeordnet wird, sollte die Stimulation des BCR-Signalwegs sowie eine Inhibierung einer zentralen Tyrosinkinase des Signalwegs in Zellkultur vorgenommen und Unterschiede im Phosphorylierungsmuster unter diesen Bedingungen quantitativ untersucht werden.

Des Weiteren sollten neue Erkenntnisse über die weniger gut untersuchten N-Phosphorylierungen, zu denen auch Phosphohistidin (pHis) gehört, gewonnen werden und eine mögliche Strategie zur Anreicherung dieser Phosphorylierung aus prokaryotischen Zellen etabliert werden. Ein direkter Transfer der Strategien für O-phosphorylierte Peptide ist aufgrund der Instabilität der Phosphoamidatbindung (P-N) gegenüber Säuren nicht möglich. Ein weiteres Ziel war daher, Strategien zur schonenden Probenvorbereitung von pHis zu entwickeln, das chromatographische Messsystem anzupassen sowie die Charakteristika von pHis in der Massenspektrometrie zu untersuchen und für die Datenauswertung zu nutzen. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten in Kombination mit einer neu entwickelten Anreicherungsstrategie zum Nachweis von endogenen pHis in komplexen Proben herangezogen werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Für LC-MS Anwendungen wurden nur hochreine Chemikalien eingesetzt (Reinheit LC-MS oder UPLC grade).

Chemikalie/Kit/Protein	Hersteller
Acetonitril	Biosolve BV, Valkenswaard, NL
Ameisensäure	Biosolve BV, Valkenswaard, NL
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich, München, DE
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Ammoniumhydroxid, 25 %	Sigma-Aldrich, München, DE
Anti-rabbit IgG (H+L) Antikörper (DyLight™ 800)	Cell Signaling, Danvers, USA
ArgC, sequencing grade	Promega, Madison, USA
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce/Thermo Scientific, Schwerte, DE
Benzonase, 99 % Reinheit	Sigma-Aldrich, München, DE
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich, München, DE
Calciumchlorid	MERCK KGaA, Darmstadt, DE
cOmplete Mini, EDTA-free	Roche, Penzberg, DE
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, München, DE
Dithiothreitol	Roche, Mannheim, DE
Glykolsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Harnstoff (Urea)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Ibrutinib (PCI-32765)	Selleck Chemicals, Houston, USA
Immunobeads rabbit Anti-human IgM	MTG (Irvine Scientific), Bruckberg, DE
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, München, DE
iTRAQ 4-Plex Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
iTRAQ 8-Plex Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Kaliumchlorid	MERCK KGaA, Darmstadt, DE
MARCKS mAb #5607	Cell Signaling, Danvers, USA
Mark12™ Unstained Standard, 2,5-200 kDa	Life Technologies, Darmstadt, DE
Myoglobin	Sigma-Aldrich, München, DE
Natriumchlorid	MERCK KGaA, Darmstadt, DE
Natriumdihydrogenphosphat	MERCK KGaA, Darmstadt, DE
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
NuPAGE LDS Probenpuffer (4x)	Life Technologies, Darmstadt, DE

Material und Methoden

NuPAGE MOPS SDS Laufpuffer (20x)	Life Technologies, Darmstadt, DE
PageRuler Plus Prestained Marker, 10-250 kDa	Life Technologies, Darmstadt, DE
Pancoll	Pan-Biotech, Aidenbach, DE
Dulbecco's PBS 1x	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Phospho-MARCKS (Ser167/170) mAb #8722	Cell Signaling, Danvers, USA
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor	Roche, Penzberg, DE
Phthalsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
RosetteSep Human B Cell Enrichment Cocktail	Stemcell Technologies, Vancouver, CA
Triethylammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Triethylammoniumphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Trifluoressigsäure	Biosolve BV, Valkenswaard, NL
Trifluoroethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	AppliChem, Darmstadt, DE
Trypsin Gold	Promega, Madison, USA
Trypsin, sequencing grade modified	Promega, Madison, USA

Verbrauchs-/Säulenmaterial	Hersteller
3M Empore C18 Filter	IVA Analystechnik, Meerbusch, DE
3M Empore C8 Filter	IVA Analystechnik, Meerbusch, DE
Acclaim PepMap Hauptsäule 75 µm x 50, 25 oder 15 cm, 3 µm	Thermo Scientific, Germering, DE
Acclaim PepMap Vorsäule 100 µm x 2 cm, 5 µm	Thermo Scientific, Germering, DE
Kinetex C18, 2,6 µm	Phenomenex, Aschaffenburg, DE
Luna C18(2) Hauptsäule 75 µm x 30 mm, 3 µm, selbst gepackt	Phenomenex, Aschaffenburg, DE
Luna C18(2) Vorsäule 100 µm x 2 cm, 5 µm, selbst gepackt	Phenomenex, Aschaffenburg, DE
Nanosep 30kDa MWCO Filter	PALL Life Sciences, Dreieich, DE
NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 12 well	Life Technologies, Darmstadt, DE
PepSwift monolithische Säule, 200 µm x 50 mm	Thermo Scientific, Germering, DE
Polysulfoethyl A, 5 µm	PolyLC, Columbia, USA
PolyWAX-LP, 2,1 x 200 mm, 5 µm	PolyLC, Columbia, USA
Poros Oligo R3 reversed-phase, 30 µm	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
PVDF Transfermembran, 0.45 µm	Life Technologies, Darmstadt, DE
SPEC C18 AR Tips	Agilent Technologies, Waldbronn, DE
Titandioxidpartikel	GL Science, Tokyo, JP
TSKgel Amid-80, 3 µm	Tosoh Bioscience, Stuttgart, DE
Zorbax, 2,1 x 150 mm 5 µm	Agilent Technologies, Waldbronn, DE

Laborgeräte	Typ	Hersteller
Zentrifugen	5424 Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, DE
	5810-R	Eppendorf, Hamburg, DE
Feinwaage	Cubis	Sartorius AG, Göttingen, DE
pH Meter	Elektrode blue line 16 pH	Schott Instruments, Mainz, DE
	pH Meter Lab 850	Schott Instruments, Mainz, DE
Photometer	Multiskan FC Microplate	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Thermomixer	Comfort mit Adapter	Eppendorf, Hamburg, DE
Ultraschallbad	Sonorex	Bandelin Electronic, Berlin, DE
Ultraschalllanze	3000 Ultrasonic Homogenizer	BioLogics, Manassas, USA
Massenspektrometer	LTQ Orbitrap Velos Pro	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
	LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
	QExactive HF	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
	Orbitrap Fusion	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
	LTQ Orbitrap Elite	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
HPLCs	UltiMate Classic	Thermo Scientific, Germering, DE
	UltiMate3000	Thermo Scientific, Germering, DE
	UltiMate3000 RSLCnano	Thermo Scientific, Germering, DE
Vakuumpzentrifuge	Savant SPD 121P	Eppendorf, Hamburg, DE
	RVC-2-18	Christ, Osterode am Harz, DE
Vortexmixer	Vortex-Genie 2T	Scientific Industries, New York, USA
Wasseraufbereitungsanlage	Purelab Prima DV35	ELGA Labwater, Celle, DE
Gelelektrophoresesystem	XCell SureLock Mini-Cell	Life Technologies, Darmstadt, DE
Western Blot System	XCell II Blot Module	Life Technologies, Darmstadt, DE
Infrarot-Scanner	Odyssey	Li-Cor, Bad Homburg, DE

Software	Hersteller
Skyline	MacCoss Labor, Washington, USA http://proteome.gs.washington.edu/software/skyline .
DAVID 6.7 – Bioinformatics Resources	https://david.ncifcrf.gov/home.jsp
Cytoscape	http://www.cytoscape.org [125]
Xcalibur 3.0	Thermo Fisher Scientific, Bremen, DE
NetworKin 3.0	http://networkin.info
MSConvert, ProteoWizard 3.0	http://sourceforge.net

Thermo Exactive Tune 1.1 SP5	Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA
phosphoRS 3.1	http://ms.imp.ac.at/?goto=phosphors
Proteome Discoverer 1.3/1.4	Thermo Scientific, Bremen, DE
Mascot Daemon 2.4	Matrix Science, London, UK
Thermo Tune 2.6	Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA
Chromleon 6.8	Thermo Scientific (Dionex), Germering, DE
R 3.1.0	https://www.r-project.org/
STRING	http://www.string-db.org
Progenesis QI 3.0	Waters, Eschborn, DE
ptmRS 3.1	http://ms.imp.ac.at/?goto=ptmrs

3.2. Methoden

3.2.1. Aufreinigung von B-Zellen und CLL-Zellen

Humane B-Zellen und CLL-Zellen wurden gemäß der Erklärung von Helsinki und des Ethikvotums des Universitätsklinikums Köln (Studiennummer 04-161) von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe unseres Kooperationspartners Dr. Frenzel (CECAD Köln) aufgearbeitet.

Sowohl gesunde B-Zellen als auch CLL-Zellen wurden negativ selektiert. Die Aufreinigung und die anschließende Kultivierung der Zellen für die Stimulationsexperimente wurden im CECAD Köln durchgeführt. Die Aufreinigung der Zellen erfolgte mit Hilfe des *RosetteSep Human B Cell Enrichment Cocktails* [126]. Hierbei wurde pro mL Vollblut 50 µL RosetteSep-Reagenz verwendet und für 20 min bei RT inkubiert. Die Negativselektion verläuft über die gezielte Vernetzung von spezifischen immunophänotypischen Oberflächenmolekülen, den *cluster of differentiation* (CD), die nicht auf B-Zellen exprimiert werden, an rote Blutkörperchen, sodass die vernetzten Zellen anschließend von den B-Zellen abgetrennt werden können. In einem weiteren Schritt wurde die Probe mit Dulbecco's PBS auf 50 mL Volumen aufgefüllt und vorsichtig auf Pancoll geschichtet. Über eine Zentrifugation (800 g x 20 min bei RT ohne Bremse) erfolgte die Auftrennung der Probe in mehrere Schichten. Die angereicherten B-Zellen befanden sich nun in einer Zwischenschicht zwischen Pancoll und Blutplasma und konnten vorsichtig abgenommen werden. Die Reinheit dieser Aufreinigung von CD19⁺/CD5⁺ Zellen beträgt, wie in der Literatur beschrieben, über 90 % [126].

Für die Stimulationsexperimente wurden die Zellen in Kultur genommen (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂). Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Inkubation der Zellen (1x10⁸ Zellen/Ansatz) mit dem Bruton-Tyrosinkinaseinhibitor Ibrutinib (Ibr) erfolgte für 3 min bei einer Konzentration von 1 µM. Anschließend wurden die Zellen mit anti-IgM (Immunoglobulin M) Immunobeads für 20 min stimuliert. Zudem wurde zu jedem Patienten eine unstimulierte Probe unter analogen Bedingungen behandelt (siehe Abbildung 3-1).

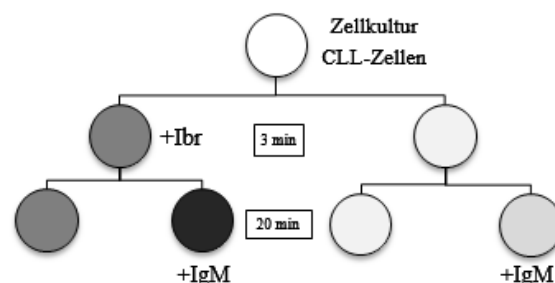


Abbildung 3-1: Übersicht über die Stimulationsexperimente der CLL-Zellen. Die Zellen wurden nach der Aufreinigung aus Vollblut für kurze Zeit in Kultur genommen, um die Auswirkungen des BTK-Inhibitors Ibrutinib (Ibr) sowie der Stimulation der Zellen mittels anti-IgM Beads (IgM) zu untersuchen. Eine Stimulation der Zellen mit anti-IgM wurde durchgeführt, um die Aktivierung des B-Zellrezeptors durch Antigenkontakt zu simulieren.

Die Lyse der gesunden B-Zellen und der CLL-Zellen wurde in modifiziertem RIPA-Lysepuffer am Forschungszentrum CECAD durchgeführt (siehe Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Modifizierter RIPA-Puffer zur Lyse der B- und CLL-Zellen. Für eine effizientere Lyse wurde 1 % SDS zum RIPA-Puffer hinzugefügt.

RIPA-Puffer
50 mM Tris-HCl, pH 8
150 mM NaCl
1 % (v/v) Nonidet P-40
0.5 % (w/v) Desoxycholsäure
1 % (w/v) SDS

3.2.2. Kultivierung von *Escherichia coli*

Der verwendete Bakterienstamm „*Escherichia coli* K12 (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919“ wurde über das DSMZ erworben (DSM Nr. 498).

Die Vorkultur sowie die anschließende Hauptkultur von *E. coli* erfolgten im Minimalmedium M63, dem Glukose als Kohlenstoffquelle zugesetzt wurde. Zudem wurde für einzelne Versuchsteile die Menge an verfügbarem Stickstoff über den Zusatz von Ammoniumsulfat variiert (siehe Tabelle 3-2) oder Glycerol als Kohlenstoffquelle eingesetzt.

Tabelle 3-2: 5x Stocklösung des Minimalmediums M63. Zusätzlich wurde eine getrennte Stocklösung ohne Ammoniumsulfat hergestellt.

5x Stock M63 Medium
500 mM KH ₂ PO ₄
9 µM FeSO ₄ x 7H ₂ O
+/- Zusatz: 76 mM NH ₄ SO ₄

Die Stocklösungen wurden autoklaviert. Nach der Verdünnung zu einem 1x Medium wurden Glukose oder Glycerol zu einer finalen Konzentration von 0,4 % (w/v) hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2,5 mM Arginin und 1 mM MgSO₄ x 7H₂O (modifiziert nach [123, 127]).

Die Vorkultur wurde in einem Volumen von 10 mL in einem Zentrifugenröhrchen bei 37 °C auf einem Schüttler (45° Winkel, 200 rpm) über Nacht inkubiert. Die Kulturen wurden jeweils bei einer OD 1-1,2 pelletiert (3000 g x 5 min, 4 °C) und in 10 mL frischem Medium resuspendiert. Für die Hauptkultur wurden 2,5 mL dieser Vorkultur in 50 mL Medium aufgenommen, sodass eine Start-OD von 0,05 vorlag. Die Kultivierung erfolgte bis zu einer OD von 0,7-1, sodass die Bakterien sich noch im logarithmischen Wachstum befanden. Die Kulturen ohne Ammoniumsulfat im Medium benötigten unabhängig von der Kohlenstoffquelle 14 h bis OD 1. Die Kulturen mit Stickstoffzusatz mussten bis zur gleichen Dichte lediglich 5 h mit Glukose sowie 8 h mit Glycerol als Kohlenstoffquelle kultiviert

werden. Das erhaltene Pellet wurde mehrfach mit PBS gewaschen (3000 g x 5 min, 4 °C) und bis zur Lyse bei -80 °C gelagert.

3.2.3. Probenvorbereitungsschritte

3.2.3.1. Zelllyse

Die Lyse der verwendeten Zellen erfolgte, mit Ausnahme der CLL- und B-Zellen (siehe Kapitel 3.2.1), in SDS-Lysepuffer (1 % (w/v) SDS, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,8). SDS bewirkt neben der Zelllyse die Denaturierung der freigesetzten Proteine. Dem Lysepuffer wurden Protease- (cOmplete Mini) und Phosphataseinhibitoren (PhosSTOP) zugegeben (1 Tablette/10 mL Puffer). Die freigesetzten Nukleinsäuren wurden mittels Benzonase Nuklease verdaut (35 U pro 100 µg Probe, 2 mM MgCl₂, 30 min bei 37 °C). Für den Aufschluss der Bakterien wurde unter Kühlung der Proben zusätzlich eine Ultraschalllanze verwendet (Amplitude 60, Puls 4, 4 Zyklen). Unlösliche Bestandteile wurden anschließend abzentrifugiert (10.000 g x 10 min) und verworfen.

3.2.3.2. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure Assay

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bicinchoninsäure Assay (BCA Assay) [128]. Hierbei handelt es sich um einen kolorimetrischen Nachweis. Durch das Vorhandensein der Aminosäuren Cystein, Tyrosin, Tryptophan sowie über die Peptidbindung werden Kupferionen in alkalischer Lösung von Cu²⁺ zu Cu¹⁺ reduziert. Die daraus resultierende Bildung eines Bicinchoninsäure-Kupfer-Komplexes führt zu einem Farbumschlag, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch detektiert werden kann.

Der Assay wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Zur Erstellung der Kalibrierkurve wurde BSA in einer Konzentration von 5-250 µg/mL (Dreifachbestimmung pro Messwert) verwendet. Die Lysate wurden so verdünnt, dass die erwartete Proteinkonzentration in dem Konzentrationsbereich der Kalibrierkurve lag. Es wurden jeweils drei Verdünnungsstufen sowie drei technische Replikate pro Verdünnung gemessen. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 60 °C konnte die Proteinkonzentration anhand der photometrischen Intensität im Vergleich zur BSA-Kalibrierkurve berechnet werden.

3.2.3.3. Carbamidomethylierung

Zur weiteren Entfaltung der Proteine wurden die enthaltenen Disulfidbrücken (Cys-Cys Verbrückungen) im nächsten Arbeitsschritt modifiziert. Hierzu wurden die Lysate mit 10 mM DTT (Dithiothreitol) für 30 min bei 56 °C reduziert. Anschließend erfolgte die Alkylierung der freien Thiolgruppen mit 30 mM IAA (Iodacetamid) für 25 min im Dunkeln bei RT (siehe Abbildung 3-2).

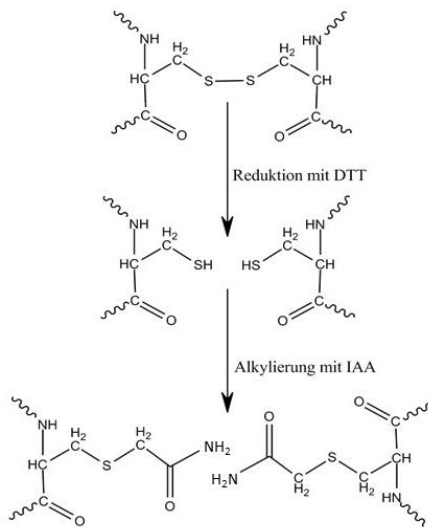


Abbildung 3-2: Carbamidomethylierung von Proteinen. DTT führt zu einer Reduktion der Disulfidbrücken in Proteinen. Die anschließende Alkylierung der Thiolgruppen durch IAA verhindert eine Rückbildung dieser Verbindung.

3.2.3.4. Ethanol-fällung und in-Lösung-Verdau

Der Verdau der Proteine aus HeLa-Zellen, Thrombozyten, *E. coli* sowie von Standardpeptiden erfolgte nach einer Ethanol-fällung mit tryptischem Verdau in Lösung.

Bei der Ethanol-fällung wurde das Lysat mit dem 9-fachen seines Volumens an kaltem Ethanol 10x verdünnt, bei $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 60 min inkubiert und die gefällten Proteine anschließend mittels Zentrifugation abgetrennt ($20.000\text{ g} \times 30\text{ min}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Das erhaltene Pellet wurde in 4 M Guanidinhydrochlorid (Gu-HCl) resuspendiert und mit 50 mM Ammoniumbicarbonat (ABC) auf $\leq 0,4\text{ M}$ Gu-HCl verdünnt, um die Effizienz der Protease nicht zu beeinträchtigen. Im Falle einer anschließenden chemischen Stabil-Isotopenmarkierung mittels iTRAQ wurde Triethylammoniumbicarbonat (TEAB) anstelle von ABC verwendet, da freie primäre Amine die Markierungseffizienz herabsetzen.

Um die katalytische Aktivität von Proteasen zu beschreiben, wird in dieser Arbeit die Nomenklatur nach Schechter und Berger verwendet (siehe Abbildung 3-3) [129].

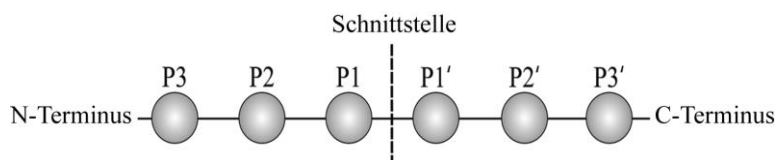


Abbildung 3-3: Nomenklatur zur proteolytischen Spaltung eines Substrats nach Schechter und Berger. Die Aminosäuren des Substrats werden mit P bezeichnet und ausgehend von der Schnittstelle mit P1 bis Pn nummeriert (C-terminal mit P') [129].

Der Verdau erfolgte standardmäßig mittels der Protease Trypsin (Trypsin *Gold MS grade* zur Verdauoptimierung, sonst *Sequencing grade modified*, beide Promega) bei 37 °C über 16 h. Zur Optimierung des tryptischen Verdaus wurden verschiedene Enzym/Protein-Verhältnisse gewählt: 1:10, 1:20, 1:50 und 1:100 (w/w) sowie die Zusätze von 5 % (v/v) Trifluoroethanol (TFE) bzw. 10 % (v/v) Acetonitril (ACN) zum Verdau puffer getestet. Zur Evaluierung des Einflusses der Phosphorylierung auf den Verdau wurden Thrombozytenlysate sowie 19 Modellpeptide mit internen enzymatischen Schnittstellen eingesetzt (siehe Tabelle 3-3), die die verschiedenen Phosphoaminosäuren sowie unterschiedliche Abstände der Phosphorylierung zur Schnittstelle abdecken. Der Peptidverdau erfolgte, ohne vorherige Fällung, in 50 mM ABC und 1 mM CaCl₂ für 16 h bei pH ~8. Zudem wurden der Einfluss der Inkubationszeit (4 h, 8 h oder 16 h) des Verdaus getestet. Die Versuche wurden mit mindestens zwei technischen Replikaten durchgeführt.

Tabelle 3-3: Synthetische Modellpeptide, die zur Evaluierung des Einflusses von Phosphorylierungen auf den Proteinverdau am ISAS hergestellt wurden. Phosphorylierte Aminosäuren sind in den Sequenzen mit einem Unterstrich gekennzeichnet: pT/pS/pY. Tryptische Schnittstellen sind mit „|“ markiert.

Peptidsequenz	Position Phosphoaminosäure
AAAR LSLTDPLVAER	-
AAAR L <u>p</u> SLTDPLVAER	P2'
AAAR L <u>p</u> TLTDPLVAER	P2'
AAAR L <u>p</u> YLTDPVAER	P2'
AAAR LSL <u>p</u> SDPLVAER	P4'
AAAR LSL <u>p</u> TDPLVAER	P4'
AAAR LSL <u>p</u> YDPLVAER	P4'
LSLTDPLVAER AGTDESR	-
LSLTDPLVAER AG <u>p</u> TDESR	P3'
LSL <u>p</u> SDPLVAER AGTDESR	P7
LSL <u>p</u> TDPLVAER AGTDESR	P7
LSL <u>p</u> YDPLVAER AGTDESR	P7
L <u>p</u> SLTDPLVAER AGTDESR	P9
L <u>p</u> TLTDPLVAER AGTDESR	P9
L <u>p</u> YLTDPVAER AGTDESR	P9
QQR R GSLPEISNLR	-
QQR R G <u>p</u> SLPEISNLR	P2'/P3'
QQR R G <u>p</u> TLPEISNLR	P2'/P3'
QQR R G <u>p</u> YLPEISNLR	P2'/P3'

Des Weiteren wurde die Verdaueffizienz von Arg-C anhand ausgewählter Phosphopeptide aus Tabelle 3-3 untersucht. Hierzu wurden die Peptide entsprechend der Herstellerangabe mit einem Enzym/Peptid-Verhältnis von 1:50 und 1:100 (w/w) unter den oben beschriebenen Bedingungen verdaut.

Zur Auswertung der Effizienz der Proteasen wurden basierend auf der Anzahl an PSMs (*peptide spectrum matches*), somit über *spectral counting* (η_{PSM}), oder über die Fläche der extrahierten Ionenchromatogramme (*XIC*, η_{XIC}) des voll tryptischen Peptids sowie des unvollständig verdauten Peptids mit überlesenen Schnittstellen („*missed-cleavage*“) folgende Formeln herangezogen:

$$\eta_{\text{psm}} = \frac{\text{Anzahl voll tryptische PSM}}{\text{Anzahl (voll tryptische PSM + "missed - cleavage" PSM)}} \quad (1)$$

$$\eta_{\text{xic}} = \frac{\text{Fläche voll tryptische PSM}}{\text{Fläche (voll tryptische PSM + "missed - cleavage" PSM)}} \quad (2)$$

3.2.3.5. Filter assisted sample preparation - FASP

Die klinischen Proben (B-Zellen und CLL-Zellen) wurden nach einem am ISAS optimierten Protokoll basierend auf den FASP-Protokollen nach Wisniewski *et al.* [130] und Manza *et al.* [131] aufkonzentriert und verdaut. Dieses Protokoll hat sich für Probenmengen bis 200 µg bewährt und zeigte in Vorversuchen eine höhere Reproduzierbarkeit als vergleichbare Verdaue in Lösung. Zudem ermöglicht das FASP-Protokoll die Umpufferung von SDS-haltigen Puffern auf detergenzienfreie Puffer.

Zunächst wurden jeweils maximal 150 µg Protein über einen Membranfilter (30 kDa MWCO) aufgereinigt. Die lysierten Proben wurden zu Beginn auf eine finale SDS-Konzentration von ≤0,3 % (v/v) mit dem Ladepuffer verdünnt (siehe Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4: Zusammensetzung der Puffer des optimierten FASP-Protokolls und verwendete Volumina.

Pufferbezeichnung	Zusammensetzung	Volumina
Ladepuffer	8 M Harnstoff (frisch), 100 mM Tris-HCl, pH 8,5	Finale Konz. ≤0,3 % SDS (v/v)
Waschpuffer I	50 mM TEAB, pH 8	100 µL
Waschpuffer II	20 % (v/v) ACN	100 µL
Verdaupuffer	50 mM TEAB, 0,1 M Harnstoff (frisch), 1 mM CaCl ₂ , pH 8	100 µL
Elutionspuffer I	50 mM TEAB, pH 8	50 µL
Elutionspuffer II	H ₂ O	50 µL

Die Proteine wurden auf dem Filter dreimal mit Ladepuffer und dreimal mit Waschpuffer I gewaschen (Zentrifugation 13.800 g x 15 min). Zusätzlich wurden zwei Waschschrte mit 20 % ACN eingeführt, um eine bessere Entfernung des Detergens Nonidet P-40 (enthalten im RIPA-Puffer) zu erreichen, welches die chromatographische Auftrennung und die Elektrospray-Ionisation stört.

Der Verdau erfolgte mit einem Trypsin/Protein-Verhältnis von 1:20 (w/w) bei 37 °C über Nacht. Nach der Inkubationszeit wurden die Peptide durch Zentrifugation (13.800 g x 10 min) in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden die auf dem Filter verbliebenen Peptide durch weitere Elutionsschritte eluiert und mit 10 %iger TFA auf pH ≤ 2 angesäuert.

Für eine anschließende Stabil-Isotopenmarkierung mittels iTRAQ wurden die Proben vollständig eingetrocknet und anschließend in 30 μ L 50 mM TEAB aufgenommen. Das weitere Vorgehen wird in Abschnitt 3.2.4 beschrieben.

3.2.3.6. Verdaukontrolle mittels Monolith

Nach dem proteolytischen Verdau wurde die Verdaueffizienz mittels chromatographischer Auftrennung auf einer monolithischen C18-Säule überprüft [46]. Monolithische Säulen erlauben sowohl die Auftrennung von Proteinen als auch von Peptiden, da sie aufgrund ihrer Polymerstruktur (Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymere) sowohl Makro- (≥ 50 nm) als auch Mesoporen (≤ 50 nm) besitzen [132-133].

Für die Verdaukontrolle wurden jeweils 0,5 μ g der verdauten sowie der unverdauten Probe (Aliquot vor Zugabe der Protease) eingesetzt. Das Laden der Probe erfolgte in 0,1 % (v/v) TFA (Lösungsmittel A), bei einem Fluss von 2,2 μ L/min. Die Probe wurde für 15 min über einen binären Gradienten von 5-60 % B (Lösungsmittel B: 84 % (v/v) ACN, 0,08 % (v/v) TFA) von der Säule eluiert.

Aufgrund ihrer geringeren Größe und Hydrophobizität besitzen Peptide eine kürzere Elutionszeit als Proteine, sodass anhand des UV-Chromatogramms (214 nm) der Anteil an unverdaulichem Protein in einer Probe abgeschätzt werden kann (siehe Abbildung 3-4) [46].

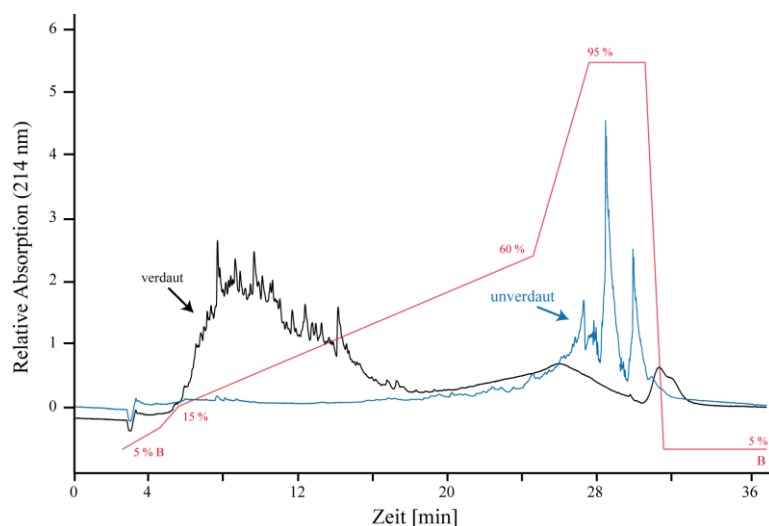


Abbildung 3-4: Verdaukontrolle mittels Monolith. Intakte Proteine (blau), z. B. aus unverdauten Proben, eluieren bei einem höheren Anteil an Organik als Peptide (schwarz) und können mittels monolithischer Trennung auch in einem gemeinsamen Lauf analysiert werden.

3.2.3.7. *In vitro* Phosphorylierung von Histidin

Kaliumphosphoramidat (PP) ermöglicht die selektive Phosphorylierung von Histidinen in alkalischer Lösung und wurde in dieser Arbeit für die *in vitro* Phosphorylierung von Histidinen auf Protein- und Peptidebene verwendet. PP wurde nach dem Protokoll von Matthews und Wei [21] vom Technischen Service Bioanalytik am ISAS hergestellt und die Reinheit des Produktes mittels ^{31}P -NMR überprüft.

Für die *in vitro* Phosphorylierung wurde die Probe in der Vakuumzentrifuge komplett getrocknet und in 20 mM ABC, pH 8, aufgenommen. Um einen hohen Anteil (~40-50 %) an phosphoryliertem Peptid zu erreichen, wurde ein 100-facher molarer Überschuss an PP (100 mM) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 25 °C unter leichtem Schütteln (300 rpm).

PP stellt ein mildes Phosphorylierungsreagenz dar, welches nicht zur Phosphorylierung von Hydroxyminosäuren führt [21]. Zudem konnte in aktuellen Studien trotz mehr als 6000-fachem molaren Überschuss an PP zu verfügbaren Histidinen keine Nebenreaktion an Lysin nachgewiesen werden [120].

Die anschließende Aufreinigung der pHis-Peptide erfolgte mittels SCX (siehe Kapitel 3.2.5), um den Anteil des phosphorylierten Peptids zu erhöhen. Als Peptide wurden bereits synthetisierte Peptide u.a. aus der laborinternen Peptidbibliothek, ausgewählt (siehe Tabelle 3-5).

Tabelle 3-5: Synthetische Peptide, die mittels Kaliumphosphoramidat an Histidin phosphoryliert wurden. Die unmodifizierten Peptide wurden der ISAS internen Peptidatenbank entnommen. PP = *in vitro* phosphoryliert. Phosphorylierte Aminosäuren sind mit einem Unterstrich gekennzeichnet.

Peptid ID	Peptidsequenz
434	VILGSPAHR
434PP	VILGSPA <u>p</u> HR
401	FYVHNDIFR
401PP	FYV <u>p</u> HNDIFR
441	VGGHAAEYGAEALER
441PP	VGG <u>p</u> HAAEYGAEALER
397	FLVVAHDDGR
397PP	FLVVA <u>p</u> HDDGR
437	VVAGVANALAHR
437PP	VVAGVANAL <u>p</u> HR
69a	HFG <u>p</u> SFQK
69aPP	<u>p</u> HFG <u>p</u> SFQK
68a	AFQYH <u>p</u> SK
68aPP	AFQY <u>p</u> H <u>p</u> SK
929	VTLDTATYVPIDDHK
929PP	VTLDTATYVPID <u>p</u> HK

Zudem wurden unverdautes BSA sowie Myoglobin (je 1 mg/mL) mit 100 mM PP unter den oben genannten Reaktionsbedingungen für 12 h inkubiert. Die *in vitro* phosphorylierten Proteine wurden

unverdaut für Western Blots oder nach Carbamidomethylierung und tryptischem Verdau für LC-MS Analysen eingesetzt.

3.2.3.8. Entsalzung mittels Festphasenextraktion

Die weitere Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Proben erfolgte durch die Entsalzung mittels C18-Festphasenextraktion (SPE). Dieser Schritt ist vor allem für eine anschließende Auftrennung der Probe mittels Ionenaustausch-Chromatographie wichtig, da Salze die Interaktion der Peptide mit der stationären Phase stören.

Für Peptidmengen $\geq 100 \mu\text{g}$ wurden kommerziell erhältliche SPEC C18-Kartuschen verwendet. Die Entsalzung von geringeren Peptidmengen sowie von angereicherten Phosphopeptidproben erfolgte mittels porösem Oligo R3-Material. Das R3-Material ist ein Polymer (quervernetztes Polystyrol-Divinylbenzol), das besonders die Aufreinigung von kleinen, hydrophilen Peptiden ermöglicht [134]. In Kombination mit einer C18-Scheibe wurde hieraus eine Entsalzungskartusche in einer $200 \mu\text{L}$ Pipettenspitze hergestellt. Für das R3-Bett wurden 5 mg R3 in $200 \mu\text{L}$ 70% (v/v) ACN gelöst und manuell durch die Filterspitze gedrückt, sodass ein etwa 5 mm hohes R3-Materialbett vorlag. Das Vorgehen ist in Tabelle 3-6 zusammengefasst.

Tabelle 3-6: Standardprotokoll zur Entsalzung von Peptiden mittels R3-Material. Für die größeren SPEC C18-Kartuschen wurden die Volumina auf jeweils $200 \mu\text{L}$ angepasst.

Arbeitsschritt	Lösungsmittel
Ansäuern der Probe auf $\text{pH} < 2$	mit 10% TFA
Aktivierung	$2 \times 40 \mu\text{L}$ 100% (v/v) ACN
Äquilibrierung	$2 \times 40 \mu\text{L}$ $0,1 \%$ (v/v) TFA
Laden	$2 \times$ angesäuerte Probe
Waschschritte	$2 \times 60 \mu\text{L}$ $0,1 \%$ (v/v) TFA
Elution	$40 \mu\text{L}$ 70% (v/v) ACN in $0,1 \%$ (v/v) TFA

Zu beachten ist, dass der Durchfluss nach dem ersten Laden der Probe, um Probenverluste zu minimieren, erneut aufgetragen wurde und dass die Schritte entweder manuell oder per Zentrifugation (max. 1250 g) erfolgten.

Für die Analyse von pHis-Proben wurde $0,01 \%$ FA statt $0,1 \%$ TFA verwendet und zudem das Eluat durch Zugabe von 25% igem NH_4OH (Ammoniumhydroxid) neutralisiert, um eine Dephosphorylierung zu vermeiden und die Kompatibilität mit Ionenaustauschern zu gewährleisten.

3.2.4. Stabil-Isotopenmarkierung mittels iTRAQ

In dieser Arbeit wurde eine Stabil-Isotopenmarkierung mittels iTRAQ für die Quantifizierung von Patientenproben eingesetzt [103]. Je nach Anzahl der zu vergleichenden Proben wurde das 8-plex oder

das 4-plex Kit verwendet. Die Markierungseffizienz lag bei allen Versuchen über 99 %. Die Proteinmengen wurden anhand der Konzentrationen des BCA Assays bestimmt und, falls notwendig, nach einer ersten LC-MS Messung von 1 µg der verdauten Probe, angeglichen, sodass für die Proben untereinander ein Verhältnis von 1:1 angenommen werden konnte. Die Proben wurden im Vakuum getrocknet und laut Herstellerprotokoll markiert: Hierzu wurden die enthaltenen Label mit 70 µL Ethanol (4-plex) bzw. Isopropanol (8plex) verdünnt und zu der in 30 µL 0,5 M TEAB gelösten Probe hinzugegeben. Die Reaktion erfolgte für 1 h (4-plex) bzw. 2 h (8-plex) bei RT. Die unterschiedlich markierten Proben wurden anschließend in einem neuen Eppendorfgefäß vereint. Nachdem 5 % der Proteinmenge für eine globale Proteinanalyse abgenommen wurden, wurde die vereinte Probe für die Phosphopeptidanreicherung vollständig getrocknet. Folgende Proben wurden im Rahmen der Doktorarbeit mittels iTRAQ-Reagenzien markiert:

Tabelle 3-7: Schema der Probenmarkierung zur Quantifizierung des Einflusses der Trypsinkonzentration auf den Verdau von Phosphoproteinen. Bei Versuchsteil 1 wurden pro Label 75 µg Proteinverdau aus Thrombozyten eingesetzt, bei Teil 2 mit 5 % TFE im Verdaupuffer 60 µg pro Label.

m/z Reporterion	(1) Trypsin/Protein-Verhältnis (w/w)	(2) Trypsin/Protein-Verhältnis (w/w)
114	1:10	1:50
115	1:20	1:20
116	1:50	1:20 mit 5 % TFE
117	1:100	-

Tabelle 3-8: Schema der Probenmarkierung zur Quantifizierung von Proteinen aus CLL- und B-Zellen. Pro Label wurden 100 µg Protein eingesetzt. Die Einteilung der Patienten erfolgte nach ihrem IgVH-Genstatus: mutierter IgVH-Status (mIgVH) bzw. unmutierter IgVH-Status (uIgVH).

m/z Reporterion	Patientenproben
113	mIgVH nativ (n=4)
114	mIgVH IgM (n=4)
115	uIgVH nativ (n=5)
116	uIgVH IgM (n=5)
117	B-Zellen nativ (n=3)
118	B-Zellen IgM (n=3)

Tabelle 3-9: Schema der Probenmarkierung zur Quantifizierung der Änderungen auf Proteom- und Phosphoproteomebene in CLL-Zellen. Pro Label wurden 125 µg Protein eingesetzt. Um einen Vergleich der Proteinlevel zu ermöglichen, wurde ein Labelshift durchgeführt und 5 µg der nativen Zellen pro Patient in einer separaten Analyse gemessen.

Zustand	mIgVH Patient 1-3				uIgVH Patient 1-3			
	nativ	Ibr	IgM	IgM-Ibr	nativ	Ibr	IgM	IgM-Ibr
Label Set1	113	115	117	119	114	116	118	121
Label Set2	115	117	119	113	116	118	121	114
Label Set3	117	119	113	115	118	121	114	116

3.2.5. Verwendete Anreicherungstechniken für phosphorylierte Peptide

In dieser Arbeit wurden verschiedene Anreicherungstechniken für Phosphopeptide eingesetzt, um den unterschiedlichen Fragestellungen der Arbeit und den physikochemischen Eigenschaften der untersuchten Phosphatbindungen gerecht zu werden. Für die Anreicherung von O-phosphorylierten Peptiden wurden Titandioxidpartikel eingesetzt [109, 135]. Aufgrund der Säureinstabilität der Phosphoamidatbindung der pHis-Peptide wurden für die Anreicherung Chromatographie-basierte Verfahren wie SCX und ERLIC sowie eine Antikörper-basierte Strategie evaluiert und optimiert.

3.2.5.1. Titandioxidpartikel

Um eine spezifische Anreicherung von Phosphopeptiden aus Zelllysaten zu erreichen, wurden in Zusammenarbeit mit Frau Sonja Radau im Rahmen dieser Arbeit verschiedene TiO₂-basierte Verfahren getestet. Ziel war die Etablierung eines effizienten, sensitiven und robusten Protokolls, welches zur Anreicherung von Phosphopeptiden aus Probenmengen von wenigen Mikrogramm bis zu mehreren Milligramm geeignet ist und zudem die Analyse von iTRAQ markierten klinischen Proben ermöglicht. Die Messung der angereicherten Proben erfolgte für jeweils 120 min mittels nano-LC Auftrennung sowie eines Orbitrap Velos Massenspektrometers (HCD-Fragmentierung).

Einstufiges TiO₂-Protokoll mit selbst gepackten Filterspitzen (Verfahren Ia + Ib)

Im ersten Schritt dieses TiO₂-Protokolls nach Beck *et al.* [89] erfolgte eine C18-Entsalzung der verdauten Probe. Der zweite Schritt war die Inkubation der anzureichernden und entsalzten Proben mit den Titandioxidpartikeln (GL Science) und Ladepuffer in Eppendorfgefäßen für 30 min bei einem Titandioxidpartikel/Protein-Verhältnis von 10:1 (w/w). Die verwendeten Pufferzusammensetzungen und Inkubationszeiten sind in Tabelle 3-10 aufgelistet.

Tabelle 3-10: Auflistung der Puffer und Inkubationsschritte für die Anreicherung nach Verfahren I.

Puffer	Zusammensetzung	Inkubationsschritte
Ladepuffer	80 % (v/v) ACN, 2,5 % (v/v) TFA, (a) Phtalsäure gesättigt; (b) 1 M Glykolsäure	30 min Schüttler
Waschpuffer 1	wie Ladepuffer	2x, 1000 g x 2 min
Waschpuffer 2	80 % (v/v) ACN, 0,1 % (v/v) TFA	4x, 1000 g x 2 min
Elutionspuffer 1	250 mM ABC, pH 9	2 min Schüttler, 1000 g x 2 min
Elutionspuffer 2	125 mM ABC, 50 mM H ₃ PO ₄ , pH 10,5	2 min Schüttler, 1000 g x 2 min
Elutionspuffer 3	400 mM NH ₄ OH, pH 11,5	2 min Schüttler, 1000 g x 2 min

Im nächsten Schritt wurde die Suspension in die selbst gepackten Filterspitzen überführt. Diese bestanden aus einer 200 µL Pipettenspitze, die am unteren Ende mit C8-Material verschlossen wurde und somit als Reaktionsgefäß diente. Die Puffer konnten durch Zentrifugation (jeweils 1000 g x 2 min) verworfen werden. Lediglich bei dem Elutionsschritt wurde der Durchfluss aufgefangen. In den Inkubationszeiten war ein ständiges Durchmischen der Partikel oberhalb der C8-Fritte mittels GELoader-Spitze entscheidend für eine hohe Selektivität der Anreicherung.

Auffallend bei diesem Protokoll war die sukzessive Elution der Phosphopeptide von den Partikeln, die durch den steigendem pH-Wert von 9,5 auf 11,5 zwischen den drei Elutionspuffern erzielt werden sollte [89]. Nach der Elution erfolgte eine Ansäuerung der Proben mit FA (Endkonzentration 10 % FA), um eine β-Elimination der Phosphatgruppe zu vermeiden.

Optimiertes TiO₂-Verfahren in Eppendorfgläsern (Verfahren IIa + IIb + IIc)

In diesem Verfahren zur Anreicherung von phosphorylierten Peptiden mittels Titandioxid wurden die verdauten Proben ohne vorherige Entsalzungsschritte auf die Partikel geladen. Die verwendeten Puffer und Inkubationsschritte sind in Tabelle 3-11 dargestellt und basieren auf einem Protokoll von Engholm-Keller *et al.* [116]. Die Anreicherung wurde komplett in Eppendorfgläsern durchgeführt.

Tabelle 3-11: Auflistung der Puffer und Inkubationsschritte für die Phosphopeptidanreicherung mittels Titandioxid nach Verfahren II.

Puffer	Zusammensetzung	Inkubationsschritte
1. Durchgang (IIa + IIb + IIc)		
Ladepuffer 1	80 % (v/v) ACN, 5 % (v/v) TFA, (a) Phtalsäure, (b/c) 1 M Glykolsäure	10 min Schüttler
Waschpuffer 1	80 % (v/v) ACN, 1 % (v/v) TFA	1 min, wiederholtes Mischen
Waschpuffer 2	50 % (v/v) ACN, 0,1 % (v/v) TFA	1 min, wiederholtes Mischen
Elutionspuffer	1 % (v/v) Ammoniumhydroxid, pH 11,3	10 min Schüttler
2. Durchgang (nur IIc)		
Ladepuffer 2	70 % (v/v) ACN, 2 % (v/v) TFA	10 min Schüttler
Waschpuffer 3	10 % (v/v) ACN, 0,1 % (v/v) TFA	1 min, wiederholtes Mischen
Elutionspuffer	1 % (v/v) Ammoniumhydroxid, pH 11,3	10 min Schüttler

Im ersten Durchgang wurden die Proben zunächst komplett im Vakuum getrocknet und in 1 mL Ladepuffer 1 aufgenommen. Die erste Inkubation erfolgte für 10 min mit einem Titandioxidpartikel-/Protein-Verhältnis von 6:1 (w/w). Der Überstand dieses Inkubationsschrittes wurde, im Gegensatz zu Protokoll I, erneut mit frischen Partikeln im Verhältnis 3:1 (w/w) inkubiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 3000 g durchgeführt. Um einen Verlust von Phosphopeptiden zu minimieren, wurde ein dritter Inkubationsschritt im Verhältnis 1,5:1 (w/w) angeschlossen. Die vereinten Partikel wurden mit Waschpuffer 1 und 2 gewaschen. Nach den Waschsritten wurden sie für 5 min unter Vakuum

getrocknet, um Reste von TFA und ACN zu entfernen, die eine Elution der Phosphopeptiden von den TiO₂-Partikeln beeinträchtigen könnten.

Durch Zentrifugation wurden die Phosphopeptide nach der Elution von den Partikeln getrennt und der Überstand vorsichtig in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und im Vakuum getrocknet.

Bei Verfahren IIc wurde nach dem ersten Durchgang noch ein weiterer angeschlossen, um die Spezifität des Verfahrens zu erhöhen. Für die Anreicherung im zweiten Durchgang wurde das Eluat in Ladepuffer 2 gelöst und zweimal mit TiO₂-Partikeln im Verhältnis 6:1 sowie 3:1 (w/w) inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Waschpuffer 3 erfolgte die Elution wie im ersten Durchgang beschrieben. Da auch nach vorsichtigem Abnehmen des Überstandes noch Titandioxidpartikel in der Probe enthalten sein können, wurde das Eluat über eine Pipettenspitze mit C8 Material gefiltert, um alle Titandioxidpartikel aus der Probe zu entfernen. Zur Vermeidung einer β -Elimination der Phosphatgruppe wurden die Proben angesäuert (Endkonzentration 10 % FA).

Optimiertes TiO₂-Verfahren in Filterspitzen (Verfahren III)

Zusätzlich wurde das Protokoll II auf eine Phosphopeptidanreicherung in Filterspitzen angepasst. Als Proben wurden 1 μ g, 10 μ g, 20 μ g, 50 μ g und 100 μ g HeLa-Verdau, jeweils drei technische Replikate, eingesetzt. Nach einem ersten Ladeschritt in einem Eppendorfgefäß erfolgten alle weiteren Schritte, wie in Verfahren I, in selbst gepackten Filterspitzen. Die Pufferzusammensetzungen entsprachen denen des Verfahrens IIb (siehe Tabelle 3-11). In den Inkubationszeiten wurde die Suspension oberhalb der C8-Fritte mittels GELoader-Spitze durchmischt.

Die Reproduzierbarkeit der Anreicherung der Verfahren wurde anschließend mittels semi-quantitativer LC-MS Analyse anhand synthetisch hergestellter Phosphopeptide aus *S. cerevisiae*, die in den HeLa-Verdau hinzugefügt wurden, überprüft (siehe Tabelle 3-12). Hierbei erfolgte die Integration der Peakflächen mittels der Software Xcalibur.

Tabelle 3-12: Synthetische Peptide zur Qualitätskontrolle der Phosphopeptidanreicherung. Die Peptidsequenzen stammen aus *S. cerevisiae* und weisen keine Homologie zu humanen Peptidsequenzen auf. Es wurden je 500 fmol pro Probe hinzugefügt.

Peptidsequenz
EApTFTTNV ^p ENGER
RQpSEAFAGQNEDEADLK
VTEFLSMELAKDPIP ^p SDP ^p SER

3.2.5.2. SCX - Kationenaustausch-Chromatographie

Für die Aufreinigung und Anreicherung von pHis-Peptiden wurde ein SCX-basiertes Chromatographieverfahren bei pH 2,7 eingesetzt, da unter diesen chromatographischen Bedingungen

Peptide anhand ihrer Ladungszustände getrennt werden konnten. Hierbei eluierte die phosphorylierte Variante eines Histidin-haltigen Peptids aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppe früher als die unmodifizierte Variante.

Die Auftrennung erfolgte mittels Ultimate3000 HPLC mit einer 1 x 150 mm Polysulfoethyl A Säule. Die entsalzten und getrockneten Proben wurden in SCX-Puffer A (10 mM KH₂PO₄, 20 % (v/v) ACN, pH 2,7) aufgenommen und über einen binären Gradienten bei einer Flussrate von 80 µL/min getrennt (siehe Tabelle 3-13). Die Elution der Peptide erfolgte mittels SCX-Puffer B (10 mM KH₂PO₄, pH 2,7, 20 % (v/v) ACN, 250 mM KCl) sowie über einen Waschschrift mit 100 % SCX-Puffer C (10 mM KH₂PO₄, pH 2,7, 20 % (v/v) ACN, 600 mM NaCl), der zur Regeneration der Säule an den Gradienten angeschlossen wurde [113]. Aufgrund der Instabilität von pHis musste darauf geachtet werden, dass die Probe möglichst schnell auf die Säule geladen und pro Fraktion vorher etwa 10 % des erwarteten Volumens an 200 mM TEAB in das Auffanggefäß pipettiert wurde (pH ≥ 5), um die Hydrolyse der Phosphorylierung zu verringern.

Tabelle 3-13: Tabellarische Übersicht des verwendeten SCX-Gradienten.

Gradient [min]	Lösungsmittel B [%]	Lösungsmittel C [%]
0	0	0
10	0	0
20	15	0
28	15	0
38	30	0
49	30	0
52	100	0
57	100	0
58	0	100
63	0	100
64	0	0

Die Fraktionierung der Peptide in unterschiedliche Ladungszustände erfolgte zunächst nach einem initialen Schema, welches am ISAS für die Auftrennung von BSA etabliert war (basierend auf [113]). Die Fraktionierung konnte aber im Laufe der Arbeit anhand der Auftrennung von 200-300 pmol *in vitro* phosphorylierter Peptide sowie 30 µg verdautem pHis-BSA im Hinblick auf eine möglichst effiziente Abtrennung dreifach geladener Peptide angepasst werden. Zur Bestimmung der Ladungszustände wurden 4 µL einer Fraktion in 11 µL H₂O über 60 min mittels RP-LC-MS analysiert (ohne Entsalzungsschritt) und anschließend eine Berechnung der theoretischen Ladungszustände anhand der erwarteten Ladung der identifizierten Aminosäuren und PTMs pro Peptidsequenz bei pH 2,7 durchgeführt.

Beide Fraktionierungsschemata sind mit den entsprechenden Bezeichnungen der Fraktionen in Tabelle 3-14 aufgelistet.

Tabelle 3-14: Initiales und angepasstes Fraktionierungsschema für SCX-Auftrennungen. Zur Unterscheidung der 2+ Fraktion, wurde diese im initialen Schema markiert (*). Um eine deutlichere Trennung der einzelnen Ladungszustände zu erreichen, wurden Übergangsfractionen (Ü) gesammelt.

Initiales Fraktionierungsschema		Angepasstes Fraktionierungsschema	
Zeitraum [min]	Fraktion	Zeitraum [min]	Fraktion
0-2,5	FT (Durchfluss)	0-2,5	FT (Durchfluss)
2,5-15	1+	2,5-13,5	1+
15-34	2+*	13,5-15	1+(Ü)
34-55	3+	15-25	2+
55-65	≥4+	25-30	2+(Ü-I)
		30-35	2+(Ü-II)
		35-52,5	3+
		52,5-55	3+(Ü)
		55-65	≥4+

Zweistufige Auftrennung von komplexen Proben mit dem angepassten Fraktionierungsschema

Da ein Großteil der tryptischen Peptide sowie pHis-Peptide in der 2+ Fraktion eluierte, waren weitere Arbeitsschritte notwendig, um pHis-Peptide gezielt aus einer komplexen Probe, wie *E. coli* Zelllysat, anzureichern.

Im ersten Schritt wurden die tryptischen Peptide wie bei der einstufigen SCX-Fraktionierung anhand ihrer Ladungszustände aufgetrennt. Zur Überprüfung der Ladungszustände wurden 4 µL jeder Fraktion direkt mittels LC-MS gemessen und das restliche Volumen pro Fraktion eingetrocknet. Die getrockneten Proben wurden anschließend in einem Zwischenschritt mit 1 % TFA für 60 min bei 60 °C inkubiert, sodass durch die Abspaltung der Phosphatgruppe am Histidin eine Erhöhung der Nettoladung der Peptide um 1+ erfolgte.

Nach einem Entsalzungsschritt erfolgte eine zweite SCX-Fraktionierung der Fraktionen 1+ und 2+, mit dem gleichen HPLC-Gradienten und Fraktionierungsschema wie in der ersten Auftrennung. Hierbei wurden die Fraktionen 2+(Ü-II), 3+ sowie ≥4+ (kombiniert mit 3+(Ü)) getrocknet, mit R3-Material entsalzt sowie anschließend für die LC-MS Analyse in 15 µL 0,1 % TFA aufgenommen und jeweils 1/3. jeder Fraktion über 90 min gemessen.

Diese zweistufige Strategie wurde anhand von 30 µg tryptisch verdaulichem pHis-BSA getestet und abschließend zur Anreicherung von pHis-Proteinen aus je 200 µg *E. coli* angewendet (Duplikat-Analyse). Da diese Auftrennung lediglich einen indirekten Nachweis der Phosphorylierung ermöglichte, wurden als Negativkontrollen ebenfalls 2 x 200 µg *E. coli* Verdau eingesetzt und vor der ersten SCX-Fraktionierung mit Säure inkubiert (1 % TFA, 60 min bei 60 °C). Zur Vermeidung von falsch positiven Ergebnissen bei der Auswertung wurden nur Peptidsequenzen mit ≥2 PSM und ohne Identifizierung in beiden Negativkontrollen berücksichtigt.

3.2.5.3. ERLIC - Electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography

Für den direkten Nachweis von pHis wurde ERLIC als ein weiteres chromatographisches Verfahren evaluiert. ERLIC wurde mittels Ultimate Classic HPLC mit einem FAMOS Autosampler durchgeführt. Als Säule wurden eine 2,1 x 200 mm sowie eine 4,6 x 200 mm PolyWAX Säule bei einer Flussrate von 200 μ L/min bzw. 1 mL/min verwendet.

Die mittels R3-Material entsalzten Proben wurden in ERLIC-Puffer A (20 mM Methylphosphonsäure, 70 % (v/v) ACN, pH 2) aufgenommen und über 7 min mit 100 % A eluiert. Anschließend erfolgte die Trennung über einen linearen Gradienten von 0-100 % ERLIC-Puffer B (200 mM Triethylammoniumphosphat, 60 % (v/v) ACN, pH 2) für 15 min und 100 % B für weitere 15 min.

Die Fraktionierung erfolgte manuell und wurde an die jeweilige Probe angepasst (siehe Kapitel 4.4.4). Hierbei war entscheidend, dass Natriumhydroxid (NaOH) in wässriger Lösung in die Fraktionsgefäße vorgelegt wurde, um die sauren ERLIC-Puffer zu neutralisieren (auf pH \geq 5).

Optimierung des ERLIC-Puffersystems zur pHis-Anreicherung

Um die Dephosphorylierung von pHis-Peptiden zu verringern, wurde der pH-Wert des ERLIC-Puffers A mit 1 M NaOH auf pH 3,0, pH 3,5 und pH 5,0 eingestellt. Die Auswirkungen des pH-Wertes auf die Auftrennung und Retentionszeiten von N- und O-phosphorylierten Peptiden wurden mittels je 3 μ g-10 μ g verschiedener synthetischer Peptide (siehe Tabelle 3-5 und Peptid ID 390 LSpSVLSPR) sowie mittels 20 μ g pHis-BSA, welches tryptisch verdaut wurde, getestet. Hierzu wurde der Verdau mit R3-Material entsalzt, im Vakuum getrocknet und nach Aufnahme in ERLIC-Puffer A, pH 3, fraktioniert. Insgesamt wurden zwölf Fraktionen anhand der Signale des UV-Chromatogramms gesammelt. Von jeder Fraktion wurde 1 % des Volumens mittels 60 minütiger LC-MS Analyse, mit TFA/FA-Standardpuffersystem gekoppelt an ein Orbitrap Elite Massenspektrometer (HCD) analysiert. Die erhaltenen Daten wurden auf \leq 5 % FDR sowie *Mascot Peptide Score* \geq 15 vorgefiltert und zusätzlich manuell validiert.

Nach der Optimierung des Puffersystems erfolgte die Anreicherung von pHis-Peptiden aus *E. coli*. Wie bei der Anreicherung mittels SCX wurde die Probe (400 μ g pro Ansatz, Duplikat-Analyse) zur Hälfte als Negativkontrolle mit Säure behandelt (1 % TFA, 60 min bei 60 °C) und unter den gleichen Bedingungen bearbeitet. Manuell wurden insgesamt 14 Fraktionen gesammelt (siehe Tabelle 3-15 sowie die Chromatogramme in Kapitel 4.4.4.). Die direkte Identifizierung der phosphorylierten Peptide erfolgte nach Neutralisation der Proben mit 1 M NaOH, Vakuumtrocknung sowie anschließender Entsalzung mittels des angepassten Protokolls mit 0,01 % FA für pHis-Proben. Von den Fraktionen 1-3 wurden 20 % (v/v), von den Fraktionen 4-14 33 % (v/v) mittels LC-MS über 60 min gemessen. Hierbei wurde das TFA/FA-Standard-LC-System mit 5 min Aufspülzeit auf die Vorsäule in Kombination mit einem QExactive Massenspektrometer eingesetzt. Für die Auswertung wurden die Fraktionen 4 bis 13

berücksichtigt, da in den ersten 8 min keine phosphorylierten Peptide nachweisbar waren. Zudem erfolgte eine Filterung der Daten auf ≤ 5 % FDR sowie ein Vergleich der Phospho-PSM mit den beiden Negativkontrollen. Für die Bestimmung der Position einer Phosphorylierung in einer identifizierten Aminosäuresequenz wurde der Algorithmus ptmRS (sichere Lokalisierung mit ptmRS-Wert ≥ 90 %) zusätzlich zu Mascot eingesetzt. Zudem wurden die MS/MS Spektren von potentiellen pHis-Peptiden manuell auf Neutralverluste überprüft und, wenn möglich, mittels synthetischer Peptide validiert.

Tabelle 3-15: Fraktionierungsschema für den *E. coli* Verdau in ERLIC. Als Probe wurden jeweils 400 μ g *E. coli* Verdau eingesetzt.

Fraktion	Zeitraum [min]
1	5-6
2	6-7
3	7-8
4	8-9
5	9-10
6	10-11
7	11-12
8	12-13
9	13-14
10	14-15
11	15-17
12	17-18
13	18-19
14	19-22

3.2.5.4. HILIC - Hydrophile Interaktionschromatographie

Um die Komplexität der angereicherten Phosphopeptidproben weiter zu reduzieren, wurde eine HILIC-Auftrennung an die zweistufige Anreicherung des TiO₂-Verfahrens IIc angeschlossen (siehe Kapitel 3.2.5.1). Dieses HPLC-System wurde im Rahmen dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Frau Sonja Radau am ISAS etabliert und optimiert.

Grundsätzlich wurden die Proben mittels R3-Material entsalzt, eingetrocknet und in HILIC-Puffer A (98 % (v/v) ACN, 0,1 % (v/v) TFA bzw. FA) aufgenommen. Daraufhin wurde die Probe für 20 min bei 1 % B (0,1 % (v/v) TFA bzw. FA) auf eine selbst gepackte TSKgel Amid-80 Säule (150 bzw. 250 μ m x 15 cm) aufgespült (siehe auch Etablierung des HILIC-Systems Kapitel 4.1.2).

Die Trennung erfolgte zunächst über einen binären Gradienten von 1-5 % B in 5 min, 5-40 % B in 25 min und 40-80 % B in 10 min mit einer anschließenden Äquilibrierung der Säule bei 1 % B. Der initial verwendete Gradient wird im Folgenden als G1 bezeichnet. Die eluierenden Peptide wurden manuell anhand der Signale des UV-Chromatogramms gesammelt. Bei der Optimierung des HILIC-

Systems erfolgte die Fraktionierung zunächst über den gesamten Gradienten G1, um mögliche Probenverluste ausschließen zu können (siehe Abbildung 3-5).

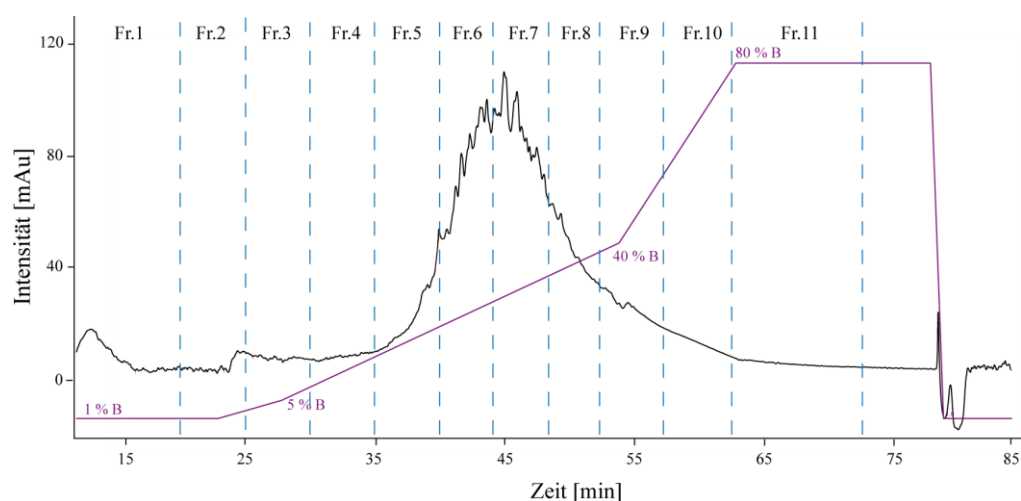


Abbildung 3-5: Auftrennung eines TiO₂ angereicherten HeLa-Verdau mittels initial verwendetem HILIC Gradienten G1 und Fraktionierungsschema. Das Sammeln der Fraktionen erfolgte manuell (gestrichelte blaue Linien) von 0-73 min. Die Fraktionen 1 bis 11 wurden getrocknet, in 15 µL 0,1 % TFA aufgenommen und für 120 min mittels LC-MS (Orbitrap Elite, CID) analysiert.

Für die Optimierung der Auftrennung der Phosphopeptide wurden neben dem initial verwendeten Gradienten G1 sechs verschiedene Gradienten anhand von Messungen des Proteinstandards Casein (150 pmol tryptischer Verdau) getestet, die tabellarisch in Tabelle 3-16 dargestellt sind.

Tabelle 3-16: Tabellarische Auflistung der getesteten HILIC-Gradienten. Die Testläufe wurden mit 150 pmol Caseinverdau durchgeführt. Anschließend erfolgte eine LC-MS Messung ausgewählter Fraktionen.

Gradient	G1	G2	Gradient	G3	G4	G5	Gradient	G6	G7
[min]	[%B]	[%B]	[min]	[%B]	[%B]	[%B]	[min]	[%B]	[%B]
0	1	1	0	1	1	1	0	1	1
20	1	1	20	1	1	1	20	1	1
25	5	10	21	10	10	10	21	10	10
50	40	40	45	40	35	30	60	35	45
60	80	80	55	80	80	80	65	80	80
75	80	80	65	80	80	80	70	80	80
76	1	1	66	1	1	1	71	1	1
90	1	1	80	1	1	1	80	1	1

Des Weiteren wurde der Gradient G6 im Vergleich zu G1 für die Auftrennung von Aliquoten aus 5 mg TiO₂ angereichertem HeLa-Lysat (Aliquote entsprachen einer Startmenge von 5 µg/µL nach TiO₂ Anreicherung), eingesetzt und das Fraktionierungsschema so angepasst, dass Fraktionen lediglich zwischen 30 und 70 min gesammelt wurden (siehe auch Abbildung 4-6). Die LC-MS Analyse erfolgte

pro Fraktion für 60 min mittels nano-LC und einem Orbitrap Velos Massenspektrometer im CID-Modus.

Bei der HILIC-Fraktionierung der TiO₂ angereicherten CLL-Proben mit Gradient G6 wurden ebenfalls Fraktionen ab 30 min gesammelt. Das Sammeln der Fraktionen erfolgte nach folgendem Schema: Fraktion 1 von 30-40 min sowie ab 40 min in 3 minütigen Intervallen. Insgesamt wurden zwölf Fraktionen pro iTRAQ-Experiment (Set 1-3) gesammelt und jede Fraktion über 90 min mittels nano-LC und einem QExactive Massenspektrometer analysiert.

3.2.6. Fraktionierung mittels Umkehrphasen-Chromatographie bei pH 6

Die Fraktionierung der globalen CLL-Proben mittels C18 RP-Chromatographie bei pH 6 wurde eingesetzt, um die Komplexität der einzelnen Probe zu verringern und eine höhere Abdeckung des Proteoms zu erzielen. Eine hohe Orthogonalität dieser Auftrennung zur anschließenden sauren RP-Chromatographie (0,1 % TFA/FA-Puffersystem) wurde durch den Einsatz von Ammoniumacetatpuffer bei pH 6 erreicht. Die Auftrennung der entsalzten Proben erfolgte auf einer Ultimate3000 HPLC, mit einem Fluss von 10 µL/min über einen binären Gradienten von 3-45 % B für 60 min in Lösungsmittel A: 10 mM Ammoniumacetat, pH 6 sowie Lösungsmittel B: 84 % (v/v) ACN, 10 mM Ammoniumacetat, pH 6 auf einer Zorbax Säule (2,1 x 150 mm). Die Probe wurde minütlich mittels einer automatischen Fraktionierungseinheit in insgesamt 20 Fraktionen gesammelt, in dem die 21. mit der 1. Probe, die 22. mit der 2. Probe usw. vereinigt wurde.

Nach der pH 6-Fraktionierung wurde jede Fraktion getrocknet und für die LC-MS Analyse in 15 µL 0,1 % (v/v) TFA resuspendiert. Die Analyse der Fraktionen erfolgte mittels QExactive Massenspektrometer über 90-120 min. Alle Messungen von iTRAQ markierten Proben wurden unter Einleitung von Ammoniumdämpfen in die Ionenquelle durchgeführt.

3.2.7. LC-MS Methoden

3.2.7.1. Parameter der nano-HPLC-Systeme

Die chromatographischen Auftrennungen für LC-MS Analysen wurden in dieser Arbeit mittels der HPLC-Systeme Ultimate3000 RSLCnano oder Ultimate3000 (zur Analyse der N-Phosphorylierung) durchgeführt.

Die aufgereinigten Proben wurden hierbei mittels C18 Umkehrphasen-Chromatographie zuerst auf einer Vorsäule aufkonzentriert und anschließend über eine Hauptsäule mit einem binären Gradienten getrennt. Für die meisten Proben wurde ein 60 bzw. 90 minütiger Gradient (entsprechend 90 bzw. 120 minütiger Gesamtlaufzeit) von 3-45 % B eingesetzt, bei einem Fluss der Ladepumpe von 20 µL/min (10 µL/min Ultimate3000) und 250 nL/min für die Hauptpumpe. Die verwendeten Laufmittel und die unterschiedlichen Säuleneigenschaften sind in Tabelle 3-17 zusammengefasst.

Tabelle 3-17: Eigenschaften der verwendeten Säulen und Lösungsmittel der nanoHPLC-Systeme. Es ist das Standardpuffersystem mit TFA/FA aufgeführt (Puffersystem 1), pH 1,8-2,8.

	Ultimate3000 RSLC	Ultimate3000
Vorsäule	Acclaim PepMap C18, 100 µm x 2 cm	Acclaim PepMap C18 oder selbst gepackt: Luna C18(2), 100 µm x 2 cm
Hauptsäule	Acclaim PepMap C18, 75 µm x 50 cm bzw. 15 cm (synth. Peptide)	Acclaim PepMap C18 oder selbst gepackt: Luna C18(2), 75 µm x 25 bzw. 30 cm
Säulenofen	60 °C/ 35 °C	35 °C
Lösungsmittel Vorsäule	0,1 % (v/v) TFA	wie Ultimate3000 RSLC, zusätzlich siehe Tabelle 3-18
Lösungsmittel Hauptsäule	A: 0,1 % (v/v) FA, B: 0,1 % (v/v) FA; 84 % ACN (v/v)	wie Ultimate3000 RSLC, zusätzlich siehe Tabelle 3-18

Optimierung der Lösungsmittel zur pHis-Analyse

Zur Optimierung der Analyse von pHis mittels LC-MS wurden neben dem Standard TFA/FA-Puffersystem (Puffersystem 1) verschiedene Lösungsmittel mit unterschiedlichen pH-Werten getestet (siehe Tabelle 3-18). Für die Messungen wurden jeweils 200 fmol verdautes pHis-BSA in 15 µL 0,01 % FA gelöst und über einen 60 minütigen Gradienten von 3-45 % B (siehe Tabelle 3-18 für Lösungsmittel B) aufgetrennt (Triplikate, Orbitrap XL, CID Messung). Die Dauer des Ladeschrittes auf die Vorsäule wurde für alle Versuche auf 5 min eingestellt. Da Acclaim PepMap C18-Säulen im Basischen eine verkürzte Lebensdauer besitzen, wurden zudem selbst gepackte Luna C18(2)-Säulen für Messungen mit Ammoniumhydroxidpuffer (A: 10 mM Ammoniumhydroxid, eingestellt auf pH 8; B: 10 mM Ammoniumhydroxid, 84 % ACN, eingestellt auf pH 8) eingesetzt, die eine pH-Stabilität bis pH 10 aufweisen.

Tabelle 3-18: Getestete Lösungsmittel zur Optimierung der LC-Analyse von pHis-Peptiden. Die Tests wurden mit Acclaim PepMap Säulen sowie *in vitro* phosphoryliertem BSA als Probe durchgeführt.

Ultimate3000	Puffersystem 2	Puffersystem 3	Puffersystem 4
Vorsäule	0,1 % (v/v) FA, pH 2,6-2,8	0,1 % (v/v) Essigsäure, pH 3,2-3,4	10 mM Ammoniumacetat, eingestellt auf pH 6
Hauptsäule	A: 0,1 % (v/v) Essigsäure, pH 3,2-3,4 B: 0,1 % (v/v) Essigsäure; 84 % ACN, pH 3,2-3,4	A: 0,1 % (v/v) Essigsäure, pH 3,2-3,4 B: 0,1 % (v/v) Essigsäure; 84 % ACN, pH 3,2-3,4	A: 10 mM Ammoniumacetat, eingestellt auf pH 6, B: 10 mM Ammoniumacetat, 84 % ACN, eingestellt auf pH 6

3.2.7.2. Parameter der Massenspektrometer

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Massenspektrometer der Firma Thermo Scientific verwendet (siehe Kapitel 1.4.1).

Aufgrund der großen Anzahl an gerätespezifischen Parametern sind die wichtigsten Geräteparameter nachfolgend zusammengefasst dargestellt (siehe Tabelle 3-19).

Tabelle 3-19: Parameter der verschiedenen Massenspektrometer in Abhängigkeit von den Messmethoden.

Parameter	Orbitrap XL	Orbitrap Velos/Elite	Q Exactive (Plus/HF)		Q Exactive HF/ Fusion	
Fragmentierung	CID	CID	HCD	HCD für iTRAQ	HCD für iTRAQ phospho	HCD für PRM
MS Scan Parameter						
Auflösung	60.000	60.000	60.000	60.000	60.000	/
Max. Füllzeit [ms]	500	100	120	120	120	/
Max. Ionenzahl	$5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	/
MS/MS Scan Parameter						
Top N	5	10	15	15	15	<i>Inclusion list</i>
Auflösung	7.500	7.500	15.000	17/15.000	17/15.000	30.000
Isolationsfenster [Da]	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	0,4
Max. Ionenzahl	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$
Max. Füllzeit [ms]	100	100	120	200	250	100
Aktivierung [ms]	30	30				
Ladungsausschluss	1 ⁺ , >4 ⁺	1 ⁺ , >4 ⁺		1 ⁺ , >5 ⁺ (inkl. 1 ⁺ bei SCX)		
Norm. Kollisionsenergie	35	35	27	35/33	35/33	27

3.2.8. Datenbanksuchen und Dateninterpretation

Die Datenbanksuchen wurden in dieser Arbeit mit Hilfe der Software Proteome Discoverer 1.3/1.4 durchgeführt. Die verwendeten Datenbanken, Parameter der Suchalgorithmen sowie Filtereinstellungen sind in der nachfolgenden Tabelle 3-20 dargestellt. Lediglich für die Analyse einzelner synthetischer Peptide wurden die Rohdaten mittels ProteoWizard [136] in eine mgf-Datei (*mascot generic file*) umgewandelt, die mittels Mascot Daemon an den internen Mascotserver zur Datenbanksuche geschickt wurde.

Tabelle 3-20: Übersicht über die Einstellungen der Datenbanksuchen.

Parameter	Synth. Peptide Std Proteine	Standard (HeLa)	iTRAQ global	iTRAQ phospho	SCX/ERLIC
Datenbank	„ISAS Datenbanken“*	UniProt human (09/2014, 20.194 Einträge)			UniProt <i>E. coli</i> K12 (03/2015, 4433 Einträge)
Suchalgorithmus	Mascot [45] (Daemon)	Mascot	Sequest [44], Mascot	Sequest, Mascot phosphoRS	Mascot, ptmRS
Protease	Trypsin/Arg-C	Trypsin	Trypsin	Trypsin	Trypsin
max. überlesene Schnittstellen	2	2	2	2	2
MS Toleranz	10 ppm	10 ppm	5 ppm	5 ppm	5 ppm
MS/MS Toleranz	CID: 0,5 Da; HCD: 0,05 Da	CID: 0,5 Da; HCD: 0,05 Da	HCD: 0,05 Da	HCD: 0,05 Da	CID: 0,5 Da; HCD: 0,05 Da
Modifikationen fix	Carb (Cys)	Carb (Cys)	Carb (Cys), iTRAQ (N- term, Lys)	Carb (Cys), iTRAQ (N-term, Lys)	Carb (Cys)
Modifikationen variabel	Phospho (Ser, Thr, Tyr, His), Ox (Met)	Ox (Met)	iTRAQ (K), Ox (Met)	iTRAQ (K); Phospho (Ser, Thr, Tyr), Ox (Met)	Acetyl (N-term); Phospho (His, Ser, Thr, Tyr), Ox (Met)
Filterkriterien in PD	<i>Mascot Ion Score</i> ≥ 15	Peptide Validator/ Percolator: 1 % FDR	Target Decoy Validator: 1 % FDR	Target Decoy Validator: 1 % FDR	Percolator: 5 % FDR ERLIC, 1 % FDR SCX

Carb = Carbamidomethylierung [+57 Da]; Phospho = Phosphorylierung [+80 Da]; Ox = Oxidation [+ 16 Da]; Acetyl = Acetylierung [+ 42 Da], iTRAQ 4-plex [+145 Da], iTRAQ 8-plex [+305 Da]

* „ISAS QC Std“ (6935 Einträge) sowie „ISAS SyntheticPeptidesRagged“ (391 Einträge, 05/2015)

3.2.8.1. Auswertung der iTRAQ-Daten

Für die Auswertung der globalen iTRAQ-Daten wurden die Ergebnisse auf Proteinebene aus Proteome Discoverer verwendet und in Excel weiter ausgewertet. Es wurden nur Proteine mit mindestens zwei unigen Peptiden berücksichtigt. Um Ungenauigkeiten bei der Pipettierung der Proben und der Bestimmung der Proteinmengen auszugleichen, wurden die Proben anhand der extrahierten Reporterionenintensitäten normalisiert. Der Vergleich der verschiedenen Proben erfolgte über die Bildung von Ratios der Reporterionenintensitäten. Für die Angleichung der Proben wurde ein Median über die Proteinratios pro iTRAQ-Kanal berechnet und anhand dieser Mediane ein Normalisierungsfaktor pro Kanal in Bezug auf den Gesamtmedian (Median über die Mediane aller Kanäle) bestimmt. Um eine Skalierung der Daten zu erreichen, wurde zudem ein Median pro Protein über alle Kanäle berechnet und jedes Protein durch seinen entsprechenden Median geteilt.

Die berechneten Normalisierungsfaktoren wurden anschließend auch für die Normalisierung der angereicherten Probe herangezogen. Die Auswertung der Phosphorylierungsdaten erfolgte ausgehend von den PSM-Rohdaten aus Proteome Discoverer (1 % FDR), da auf Peptidebene Fehler bei der Gruppierung von PSM zu Phosphopeptiden in Mascot nachgewiesen werden konnten.

Zur Lokalisierung der Phosphorylierungsstellen wurde PhosphoRS als Algorithmus eingesetzt [52]. Bei der Auswertung der Phosphopeptiddaten wurden nur eine Lokalisierung der Phosphorylierung mit einer Wahrscheinlichkeit von $\geq 75\%$, bzw. $\geq 90\%$ bei den CLL-Daten, in der Auswertung berücksichtigt, da ab dieser Wahrscheinlichkeit von einer vertrauenswürdigen Lokalisierung ausgegangen werden konnte. Anhand eines Abgleichs mit der humanen UniProt-Datenbank konnte die Position der Phosphorylierungsstelle im Protein bestimmt werden. Bei der Auswertung der drei iTRAQ-Experimente zur CLL wurden nur Phosphopeptidsequenzen berücksichtigt, die in mindestens zwei der drei Experimente quantifiziert werden konnten.

3.2.8.2. Statistik der iTRAQ-CLL-Daten

Im initialen Vergleich der Proteinlevel von B- und CLL-Zellen sowie unter den CLL-Patienten wurde ein Regulationsereignis als signifikant angesehen, wenn das berechnete Proteinratio einen Wert von 1,5 oder mehr aufwies. Der Regulationsfaktor ist im Folgenden logarithmiert zur Basis 2 angegeben. Dieser Regulationsfaktor wurde anhand der Verteilung der Reporterratios auf Proteinebene sowie nach einem Vergleich mit Western Blot Daten (erstellt am CECAD, Uniklinik Köln) zu ausgewählten Proteinen festgelegt.

Bei allen weiteren Experimenten wurden, auch aufgrund der großen Heterogenität der Protein- und Phosphorylierungslevel der CLL-Patienten, die Schwellenwerte für eine Regulation mittels statistischem Test, dem sogenannten *moderated t-test* [137-138] über die Statistiksoftware R (*R-package Limma* [139]) festgelegt. Ursprünglich publiziert für die Auswertung von Microarray-Daten, konnte die Anwendbarkeit und Nützlichkeit des *moderated t-tests* bereits in proteomischen Studien mit kleiner Stichprobenanzahl und hoher Heterogenität gezeigt werden [8, 137]. Es wurde ein Schwellenwert von $p \leq 0,05$ (5 % Signifikanzniveau) angelegt, um nach signifikanten Änderungen zu filtern.

Zur Berechnung des Regulationsfaktors wurde zunächst der Median (MD) über die Phosphopeptidlevel pro Stimulationsbedingung berechnet. Nachfolgend wurde der Regulationsfaktor über das Verhältnis der Mediane der zu vergleichenden Bedingungen bestimmt und logarithmiert zur Basis 2 angegeben (*log₂ fold change*). Ein Regulationsfaktor mit einer Abweichung von mehr als drei Standardabweichungen (SD) vom Median aller Regulationsfaktoren (*log₂ fold change* $> (MD + 3 \cdot SD)$) wurde als differentiell und somit in Kombination mit einem Signifikanzwert von $p \leq 0,05$ als signifikante Veränderung angesehen.

Die Analyse und Klassifizierung angereicherter Proteinfunktionen und Signalwege erfolgte mittels der Datenbank- und Analysesoftware DAVID für KEGG-Pathway (www.genome.jp/kegg) Analysen sowie der STRING Datenbank [140] anhand der implementierten Gene Ontology (GO) [141] Funktion.

Angereicherte Signalwege und Funktionen wurden ab einem Schwellenwert von p-Wert $\leq 0,05$ berücksichtigt.

Zur Vorhersage von Kinasen, die potenziell die Phosphorylierung differentieller Phosphoproteine verantwortlich sein könnten, wurde NetworKIN 3.0 eingesetzt [142]. Es wurde nur der beste Eintrag, basierend auf dem vergebenen Score von NetworKIN, pro Phosphorylierungsstelle berücksichtigt.

3.2.9. Antikörper-basierter Nachweis von Phosphohistidin

Die Herstellung des pHis spezifischen Antikörpers erfolgte im Rahmen der Dissertation von Bart van Vliet am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie (MPI) in Dortmund. Aufgrund der Instabilität der Phosphoamidatbindung (P-N) wurde ein säurestabiles Analogon (P-C) synthetisiert (siehe Abbildung 3-6). Des Weiteren wurde das Analogon derivatisiert und zur Synthese von Peptiden verwendet, die zur Generierung des pHis spezifischen, polyklonalen Antikörpers in Kaninchen eingesetzt wurden.

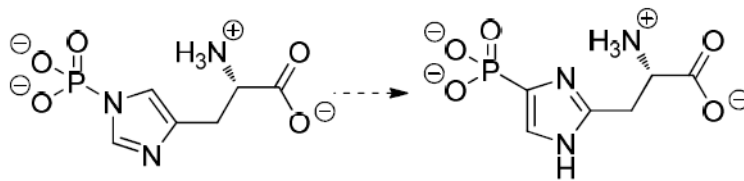


Abbildung 3-6: Vergleich von pHis und dem für die Antikörperherstellung verwendeten pHis-Analogon (zur Verfügung gestellt von B. van Vliet, MPI, Dortmund). Das säurestabile Analogon (rechts) besitzt anstatt der P-N eine P-C Bindung an Position 3 des Imidazolrings.

In dieser Arbeit wurde der generierte anti-pHis Antikörper zum Nachweis der Histidinphosphorylierung in *E. coli* mittels Immunodetektion und Immunpräzipitation verwendet. Ebenso wurde die Verwendbarkeit des Antikörpers für eine Immunpräzipitation von *in vitro* phosphorylierten Proteinen überprüft.

3.2.9.1. SDS-PAGE und Färbemethode

Die SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) wird verwendet, um Proteine anhand ihres Molekulargewichtes voneinander zu trennen. In dieser Arbeit wurden kommerziell erhältliche 12 % Bis-Tris Gele eingesetzt. Um die Dephosphorylierung von pHis zu minimieren, wurden die Proben nicht aufgekocht, sondern nur 10 min bei RT mit basischem LDS-Puffer inkubiert. Lediglich die Negativkontrollen wurden 15 min bei 95 °C aufgekocht, da nach dieser Inkubationszeit eine vollständige Dephosphorylierung im Western Blot nachweisbar war. Als Marker dienten Mark12 (2,5-

200 kDa) und PageRuler (10-250 kDa). Die Auftrennung erfolgte in MOPS-Puffer für 20 min bei 50 V und anschließend bei 200 V für 30-40 min.

Wenn das Gel nicht für eine anschließende Immunodetektion verwendet werden sollte, erfolgte eine Färbung der Proteine mittels kolloidalem Coomassie. Das durchgeführte Färbeprotokoll basiert auf der Methode von Dyballa und Metzger [143]. Hierzu wurden die Proteine zunächst mit 50 % (v/v) Ethanol/10 % (v/v) Essigsäure für 60 min im Gel fixiert. Anschließend wurde das Gel mit Wasser gründlich gewaschen und mit Coomassielösung für mehrere Stunden oder über Nacht bei 4 °C inkubiert (siehe Tabelle 3-21). Die leichte Färbung des Hintergrunds wurde mit 8 % Essigsäure entfernt.

Tabelle 3-21: Zusammensetzung der verwendeten Coomassielösung.

Coomassielösung
0,02 % (w/v) Coomassie Brilliantblau G-250
5 % (w/v) Aluminiumsulfat x 16 H ₂ O
10 % (v/v) Ethanol
2 % (v/v) Phosphorsäure

3.2.9.2. Western Blot und Immunodetektion

Die Übertragung der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran erfolgte über einen *Semiwet-Blot*. Für den Transfer wurden Whatman-Papiere, PVDF-Membran sowie Schwämme in 1x Transferpuffer getränkt (siehe Tabelle 3-22) und anschließend, nach Herstellerangaben, mit dem Gel in die Blotkammer eingebaut. Der Transfer erfolgte für 90 min bei 30 V und 4 °C.

Tabelle 3-22: Stocklösungen der Western Blot Puffer

Transferpuffer 10x Stock	Transferpuffer 1x Stock	TBST-Waschpuffer
0,25 M Tris	10 % (v/v) 10x Stock	25 mM Tris, pH 8.5
1,9 M Glycin	20 % (v/v) Methanol	137 mM NaCl
		2,7 mM KCl
		0,1 % (v/v) Tween-20

Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Antikörper-gekoppelter Fluoreszenzmarkierung. Um eine unspezifische Bindung des Antikörpers an die Membran zu verhindern, wurden alle freien Stellen auf der Membran mit 3 % (v/v) BSA in TBST-Waschpuffer blockiert. Die Inkubation erfolgte für 60 min bei RT. Anschließend wurde der primäre Antikörper zugegeben. Für den anti-pHis-Antikörper wurde eine Verdünnung von 1:2000 in TBST-Puffer eingesetzt. Die Inkubation der Membran mit dem Antikörper fand bei 4 °C über Nacht statt. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST-Waschpuffer, wurde die Membran am nächsten Tag mit dem sekundären Antikörper (*anti-rabbit IgG*,

DyLight 800CW, 1:5000 Verdünnung) für 60 min bei RT inkubiert. Die Detektion erfolgte über den am sekundären Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff mittels Infrarot-Scanner.

Um die absoluten Proteinmengen der aufgetragenen Proben zu überprüfen, wurde die Membran in einigen Fällen mit der beschriebenen Coomassielösung über Nacht gefärbt und mittels 50 % (v/v) Methanol einige Minuten entfärbt.

4. Ergebnisse

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Arbeit zunächst im Hinblick auf die Optimierung der Probenvorbereitung und spezifischen Anreicherung von O-Phosphorylierungen dargestellt. Die Übertragung der optimierten Einzelschritte auf die umfassende Analyse von Veränderungen im Phosphoproteom von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie zeigt die hohe Sensitivität dieses Ansatzes.

Im Gegensatz dazu mussten zur Untersuchung der bislang relativ unbekanntenen Phosphorylierung an Histidin zunächst grundlegende Versuche durchgeführt werden, wie etwa im Hinblick auf die Stabilität der Phosphoamidatbindung. Hier galt es zu klären, unter welchen Bedingungen eine LC-MS basierte Analyse möglich und sinnvoll wäre.

Beiden Ansätzen war jedoch gemeinsam, dass zunächst zu Optimierungszwecken auf Standardpeptide oder -proteine sowie schnell und in großen Mengen kultivierbare Zellen, z. B. HeLa-Zellen bzw. *E. coli*, zurückgegriffen werden musste, um tiefere Einblicke in das Verhalten der O- bzw. N-Phosphorylierungen in LC-MS basierten Verfahren zu erhalten.

4.1. Optimierung der O-Phosphopeptidanreicherung

Eine Herausforderung bei der Bearbeitung klinischer Proben, wie aufgereinigter Blutzellen oder Krebsgewebe, ist, dass sie oft nur in geringen Mengen von wenigen Mikrogramm zur Verfügung stehen. Daher wurde zunächst die Anreicherung von phosphorylierten Peptiden mittels Titandioxid optimiert. Diese Optimierung erfolgte im Hinblick auf (i) Sensitivität, (ii) Spezifität und (iii) Reproduzierbarkeit der Anreicherung.

Unter Verwendung von 100 µg HeLa-Verdau pro Ansatz und je drei technischen Replikaten wurden insgesamt fünf verschiedene Protokolle zur Anreicherung von Phosphopeptiden mittels TiO₂, ausgehend von bereits am ISAS etablierten Protokollen sowie eines Protokolls basierend auf einer Veröffentlichung von Engholm-Keller *et al.* [108], miteinander verglichen (siehe Abbildung 4-1). Die untersuchten TiO₂-Protokolle und ihre Unterschiede sind in Kapitel 3.2.5.1 detailliert aufgelistet.

Ein Phosphopeptid wurde nur in der Auswertung berücksichtigt, wenn die Wahrscheinlichkeit für die Lokalisierung der Phosphorylierung bei ≥ 75 % (phosphoRS-Wert) lag.

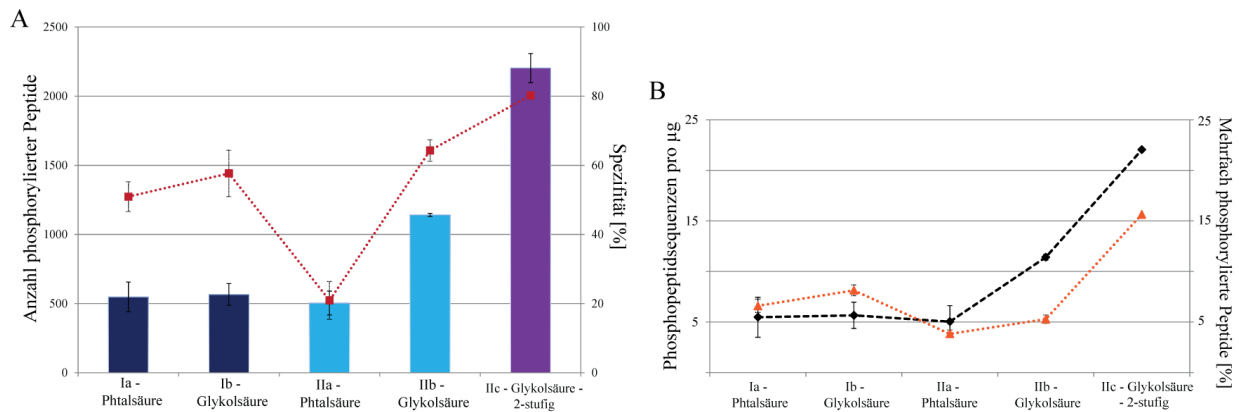


Abbildung 4-1: Zusammenfassung der Ergebnisse der getesteten TiO₂-Protokolle. (A) Vergleich der verschiedenen Strategien basierend auf der Anzahl an phosphorylierten Peptiden und der Spezifität der Anreicherung (Phosphopeptide/Gesamtanzahl der Peptide in %, Sekundärachse) von jeweils 100 µg HeLa-Lysat. (B) Vergleich der Strategien basierend auf der Anzahl an Phosphopeptidsequenzen pro µg Startproteinmenge und der Anzahl mehrfach phosphorylierter Peptide in Prozent (orange, Sekundärachse). phosphoRS-Wert ≥ 75 %.

Eine Anreicherung mittels der Filterspitzen-basierten Verfahren Ia bzw. Ib [89] führte zu der Identifizierung von 566 bzw. 548 phosphorylierten Peptiden aus 100 µg Startmenge, unabhängig von der verwendeten organischen Säure im Ladepuffer (Spezifität ~ 55 %). Bei der Anreicherung in Eppendorfgläsern mit Verfahren IIa bzw. IIb, basierend auf einem Protokoll von Engholm-Keller *et al.* [116], wurde die Probe nach dem tryptischen Verdau ohne C18-Entsalzung getrocknet und im Ladepuffer mit Titandioxidpartikel inkubiert sowie zwei zusätzliche Inkubationsschritte mit frischen Partikeln bei abnehmender Menge durchgeführt: 6:1, 3:1 und 1,5:1 (w/w) Titandioxidpartikel/Protein-Verhältnis. Zudem wurden die Partikel vor der Elution der Peptide getrocknet. Die Entfernung von TFA war notwendig, um einen stark basischen pH-Wert bei der Elution mit lediglich einem statt drei Elutionsschritten gewährleisten zu können. Diese Änderungen beeinflussten unter Verwendung des Protokolls IIa mit gesättigtem Phtalsäure-Ladepuffer zunächst nicht die Sensitivität der Phosphopeptidanreicherung. Erst durch den Ersatz von Phtalsäure mit 1 M Glykolsäure im Ladepuffer in Verfahren IIb konnte sowohl eine sensitivere (1141 Phosphopeptide) als auch spezifischere (64 % Spezifität) Anreicherung erreicht werden, was zu einer Verdoppelung der Phosphopeptidsequenzen auf 11 Phosphopeptide pro µg im Vergleich zu Verfahren I führte.

Um die Effizienz der Anreicherung weiter zu erhöhen, wurde das Eluat aus Verfahren IIb nochmals angereichert. Hierzu wurden die nach dem ersten Durchgang eluierten Phosphopeptide getrocknet und anschließend komplett für einen zweiten Durchgang TiO₂-Anreicherung eingesetzt, sodass im ersten Schritt unspezifisch an die Titandioxidpartikel gebundene, unmodifizierte Peptide weitgehend entfernt werden konnten. Die Anzahl an phosphorylierten Peptiden konnte mit dem zweistufigen Protokoll IIc um mehr als 1000 Phosphopeptide auf 2203 Phosphopeptide erhöht werden. Die Spezifität der Anreicherung lag bei 80 %. Durch das sensitivere Protokoll konnte auch die Anzahl an mehrfach phosphorylierten Peptiden erhöht werden. Nur bei diesem Verfahren war eine Detektion von niedrig

abundanten 3-fach phosphorylierten Peptiden möglich (siehe Abbildung 4-1 B). Mit dem optimierten Protokoll konnten 22 Phosphopeptidsequenzen pro μg identifiziert werden.

4.1.1. Anreicherung von geringen Probenmengen

Nachdem das optimierte Protokoll erfolgreich zur Anreicherung von Proteinmengen von 100 μg eingesetzt werden konnte, stellte sich die Frage, ob es auch für die Anreicherung von geringeren Probenmengen einsetzbar war. Kritisch zu betrachten war hier ein möglicher Verlust von Titandioxidpartikeln durch die Inkubations- und Waschschriffe, bei denen der Überstand nach der Zentrifugation manuell aus den Eppendorfgläsern abgenommen und in eine neues Gefäß transferiert wurde. Es zeigte sich, dass eine Anreicherung von 1 μg HeLa-Protein (Triplikate) mit dem oben beschriebenen Protokoll, basierend auf einer Anreicherung in Eppendorfgläsern, nicht möglich war.

Um zu überprüfen, ob ein Filterspitzen-basierter Ansatz [109] einen generellen Vorteil gegenüber dem bisherigen Verfahren bietet, wurden HeLa-Proteinmengen von 1 μg , 10 μg , 20 μg , 50 μg und 100 μg (jeweils Triplikate) in Filterspitzen angereichert, bezeichnet als Verfahren III. In den Waschschriffen wurden zusätzlich GELoader-Spitzen zum Durchmischen der Suspension in der Filterspitze verwendet, um ein Absetzen der Titandioxidpartikel zu verhindern.

Unter Verwendung des Filterspitzen-basierten Protokolls konnten aus 1 μg Startmaterial 62 Phosphopeptide angereichert werden. Die Abweichung zwischen den drei Replikaten lag bei unter 8 %. Der Vorteil der Verwendung von Filterspitzen bei geringen Probenmengen zeigte sich auch bei der Anreicherung von 10 μg Startmaterial. Hier konnten mit den selbst hergestellten Filterspitzen im Vergleich zur Anreicherung in Eppendorfgläsern 46 % mehr Phosphopeptide, 914 im Vergleich zu 626 Phosphopeptiden, identifiziert werden. Bei Proben mit einem Proteingehalt $\geq 20 \mu\text{g}$ konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Verfahren festgestellt werden.

Um sicherzustellen, dass der Probenverlust, der durch die Überführung der Probe zwischen den Eppendorfgläsern entstehen kann, die Reproduzierbarkeit der Anreicherung nicht negativ beeinflusste, wurden synthetisch hergestellt Peptide aus *S. cerevisiae*, die keine Homologie zu humanen Peptiden aufwiesen, vor der TiO_2 -Anreicherung hinzugefügt.

Anhand der Peakflächen der Vorläuferionensignale im Ionenchromatogramm (XICs) war eine markierungsfreie Quantifizierung der Peptide über die drei Replikate möglich. Die relative Standardabweichung pro Peptid lag für alle Ansätze bei weniger als 20 %. Die hohe Reproduzierbarkeit ist exemplarisch für zwei synthetische Peptide, ausgehend von 100 μg Startmaterial, in Abbildung 4-2 dargestellt.

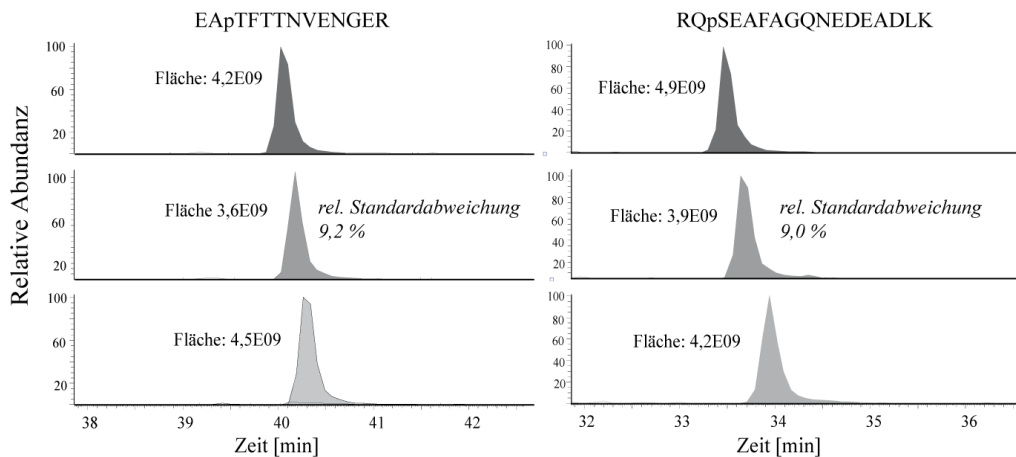


Abbildung 4-2: Überprüfung der Reproduzierbarkeit der optimierten Titandioxidanreicherung. Anhand von synthetisch hergestellten Phosphopeptiden aus *S. cerevisiae* wurde die Reproduzierbarkeit der Anreicherung überprüft. Exemplarisch sind die Peakflächen für zwei der hinzugefügten Phosphopeptide in den 100 µg HeLa Anreicherungen für drei technische Replikate gezeigt.

Mit dem Vergleich der hinzugefügten synthetischen Phosphopeptide konnte gezeigt werden, dass das neu eingeführte Protokoll zur Titandioxidanreicherung für Probenmengen ≥ 20 µg reproduzierbar, sensitiv und schnell in Eppendorfgefäßen durchgeführt werden kann. Bei geringeren Proteinmengen ist das etwas zeitintensivere Filterspitzen-basierte Protokoll vorzuziehen.

Bei einer Auftragung der Anzahl identifizierter phosphorylierter Peptide gegen die Menge an Startmaterial zeigte sich, dass die Verwendung von mehr als 50 µg Startmaterial, ausgehend von einer zweistündigen LC-MS Analyse, kaum zu einer Erhöhung an identifizierten Phosphopeptiden führte. Sowohl bei der Anreicherung von 50 µg als auch bei 100 µg HeLa-Verdau wurden etwa 2200 Phosphopeptide sowie etwa 4500 Phospho-PSM, ± 5 %, identifiziert (siehe Abbildung 4-3). Lediglich die Anzahl an aufgenommenen MS/MS Spektren (*Search Inputs*) nahm um etwa 15 % zu.

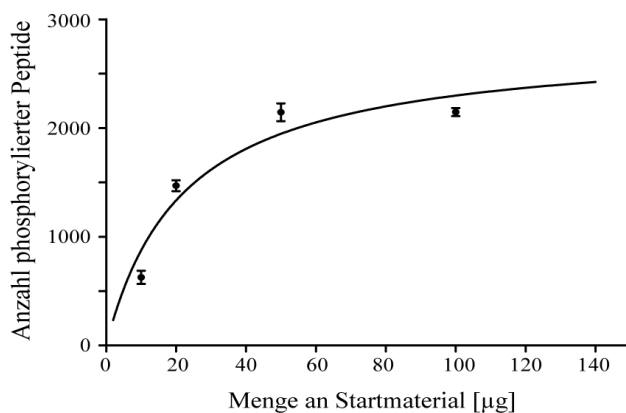


Abbildung 4-3: Zusammenhang zwischen der Anzahl an phosphorylierten Peptiden und der eingesetzten Proteinmenge. Dargestellt sind die nach TiO_2 -Anreicherung mittels zweistündiger LC-MS/MS Analyse identifizierte phosphorylierte HeLa-Peptide. Es konnten sowohl mit 50 µg Startmaterial als auch mit 100 µg etwa 2200 Phosphopeptidsequenzen nachgewiesen werden.

Eine Möglichkeit die Sensitivität der Phosphoproteinanalyse zu erhöhen, besteht in der chromatographischen Fraktionierung der Probe nach der TiO₂-Anreicherung. Die Notwendigkeit zur Etablierung einer mehrdimensionalen Anreicherung war zudem dadurch gegeben, dass bei stabil-Isotopen basierten quantitativen Analysen in der Regel die Patientenproben einzeln markiert, anschließend vereint und gemeinsam mittels LC-MS analysiert sowie relativ zueinander quantifiziert werden, sodass Proteinmengen im Milligramm Bereich als Startmaterial dienen.

Aufgrund der Kompatibilität der HILIC-Puffer mit einer anschließenden LC-MS Analyse, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein HILIC-System zur Fraktionierung etabliert und evaluiert.

4.1.2. Etablierung des HILIC-Systems

Zu Beginn der Testmessungen wurde ein Ultimate 3000 RSLCnano-System mit einer 150 µm x 150 mm selbst gepackten, Silica-basierten Säule (TSKgel Amid-80) sowie folgende Lösungsmittel verwendet: HILIC-Puffer A: 98 % ACN, 0,1 % FA (v/v) und Puffer B: 0,1 % FA (v/v). Die Auftrennung erfolgte über einen 30 minütigen Gradienten von 1-40 % B. Alle Proben wurden vor der Auftrennung entsalzt und anschließend eingetrocknet, da Salze die Auftrennung und die Reproduzierbarkeit der Messungen beeinträchtigten. Für die Injektion wurden die Proben in 15 µL HILIC-Puffer A aufgenommen.

Als Proteinstandard für die Überprüfung der Qualität der Auftrennung, hinsichtlich Retentionszeiten, Peakbreiten und -intensitäten, wurde 150 pmol verdautes Casein eingesetzt. Casein wurde gewählt, da es eine hohe Anzahl an tryptischen Peptiden sowie hoch abundante phosphorylierte Sequenzen besitzt. Es stellte sich heraus, dass bei Ansäuerung der Lösungsmittel mit FA auf 0,1 % (v/v) mehrere Peptide von Casein ein starkes Tailing aufwiesen oder teilweise an der Säule haften blieben und erst in nachfolgenden Auftrennungen eluierten. Daraufhin wurde die Zusammensetzung der Lösungsmittel auf 0,1 % (v/v) TFA geändert. Durch den Einsatz der stärkeren Säure TFA konnten die unerwünschten Wechselwirkungen der Probe, die häufig über Aminogruppen der Aminosäurereste vermittelt werden, mit den Silanolen der stationären Phase verringert werden.

Der geringe wässrige Anteil an HILIC-Puffer A erschwerte eine reproduzierbare Messung der Proben, da die entsalzten und getrockneten Analyten nicht vollständig in Lösung gebracht werden konnten. Eine Erhöhung des Injektionsvolumens war nicht möglich, da das größere Injektionsvolumen zu einer „volumetrischen Überladung“ der Säule und damit zu unscharfen Peaks bzw. Doppelpeaks führte. Aus diesem Grund wurde neben der Erhöhung des Injektionsvolumens von 15 µL auf 45 µL auch der Innendurchmesser der Säule von 150 µm auf 250 µm angepasst. Eine Erhöhung der Flussrate von 1,5 µL/min auf 2,5 µL/min ermöglichte zudem eine schnellere Analyse der Proben, ohne Verlust an Auflösung. Eine weitere Erhöhung der Flussrate war aufgrund der geringen Druckstabilität des Säulenmaterials nicht möglich.

Mit dem etablierten HILIC-System und einer Aufspülzeit der Probe auf die Säule von 20 min war eine reproduzierbare Auftrennung von Casein möglich (siehe Abbildung 4-4).

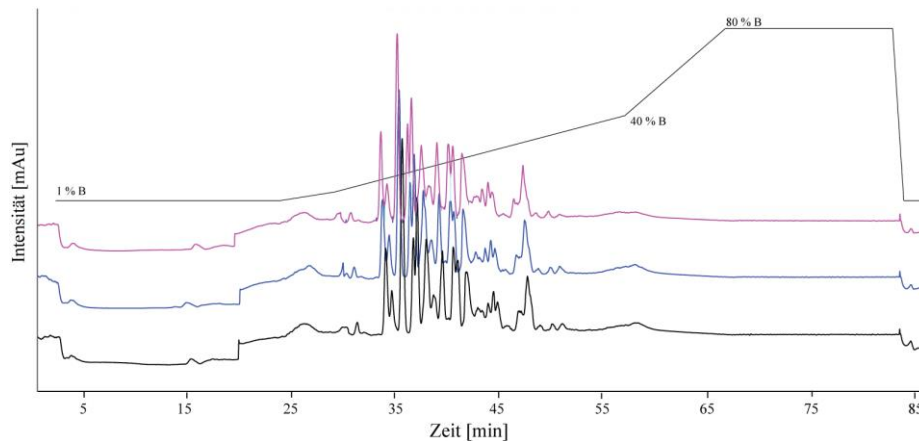


Abbildung 4-4: HILIC-Auftrennungen von 150 pmol verdautem Casein mit dem initialen Gradient G1. Mehrfachmessungen des Standards zeigten reproduzierbare Retentionszeiten und Auflösungen der Signale unter Verwendung von einer 250 μm x 150 mm TSKgel Amid-80 Säule, einem Puffersystem mit 0,1 % TFA/98 % ACN sowie einem Injektionsvolumen der zu trennenden Probe von 45 μL .

4.1.3. Optimierungsprozesse am HILIC-System

Um den Vorteil einer HILIC-Auftrennung im Anschluss an die optimierte zweistufige TiO_2 -Anreicherung zu testen, wurden 400 μg HeLa-Protein verdaut, mittels TiO_2 angereichert und auf zwei Aliquote aufgeteilt. Die zwei Aliquote wurden mittels R3-Material entsalzt und wie folgt gemessen: Ein Aliquot wurde in drei Proben aufgeteilt, einzeln mittels LC-MS für jeweils zwei Stunden analysiert und zusammen ausgewertet. Das andere Aliquot wurde mittels des initialen HILIC-Gradienten aufgetrennt, in elf Fraktionen gesammelt (siehe Abbildung 3-5) und pro Fraktion ebenfalls für zwei Stunden mittels LC-MS analysiert. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 4-5 zusammengefasst.

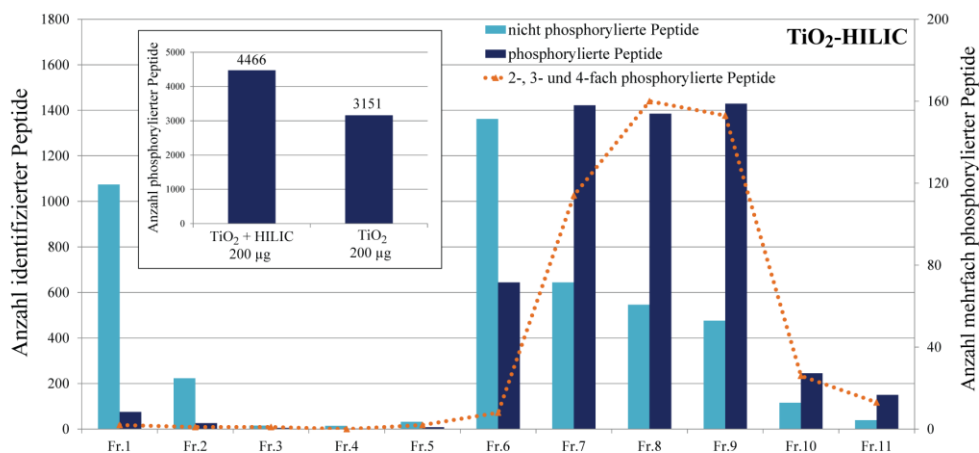


Abbildung 4-5: Vergleich der Anzahl phosphorylierter Peptide nach Titandioxidanreicherung mit und ohne HILIC-Auftrennung. Neben der Gesamtzahl an phosphorylierten Peptiden ist die Anzahl der Phosphopeptide pro gesammelter Fraktion dargestellt, die mittels LC-MS identifiziert werden konnten, sowie die Anzahl mehrfach phosphorylierter Peptide (orange, dargestellt auf Sekundärachse).

Mittels HILIC-Fraktionierung konnte eine deutliche Steigerung der Sensitivität der Anreicherung erreicht werden. Insgesamt wurden 4466 Phosphopeptide nach HILIC-Fraktionierung im Vergleich zu 3151 Phosphopeptiden bei direkter Messung identifiziert, was einer Zunahme von 42 % entspricht. Zudem konnten mehr als 300 mehrfach phosphorylierte Peptide in den Fraktionen identifiziert werden, die 7 % aller identifizierten Phosphopeptide ausmachen, während es ohne HILIC-Trennung nur 4 % waren.

Die Verteilung der Phosphopeptide zeigte allerdings, dass der Großteil im hinteren Bereich des Gradienten, ab etwa 20 % B, und größtenteils in vier der elf Fraktionen eluierte, sodass eine Anpassung des Gradienten, aber auch des Fraktionierungsschemas notwendig war.

Um die Verteilung der Phosphopeptide über den Gradienten zu optimieren, wurde zunächst der HILIC-Gradient angepasst. Anhand des Casein-Proteinstandards (150 pmol verdaut) wurden sieben Gradienten evaluiert (siehe Tabelle 3-16). Beispielhaft sind die UV-Chromatogramme der Gradienten G3, G5 und G6 im Vergleich zu dem initial verwendeten Gradienten G1 in Abbildung 4-6 dargestellt.

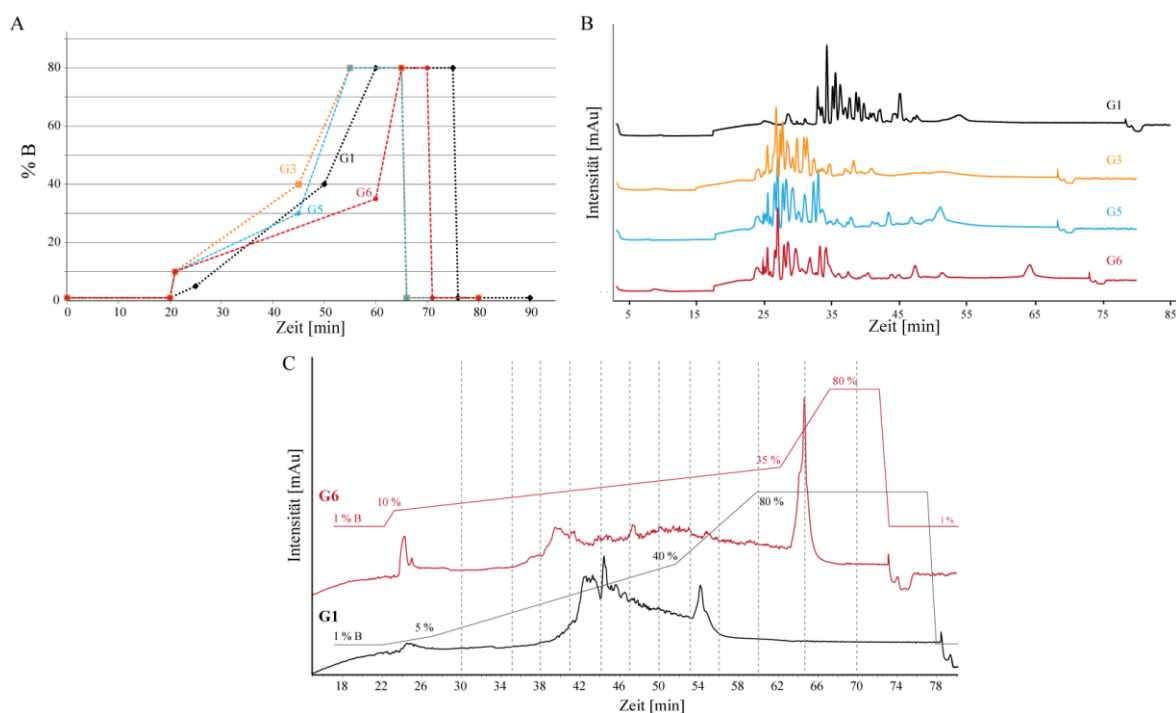


Abbildung 4-6: Optimierung des HILIC-Gradienten. Zunächst wurden anhand von 150 pmol Caseinverdau sieben Gradienten getestet: vier Gradienten G1, G3, G5 sowie G6 sind (A) graphisch sowie (B) mit den zugehörigen UV-Chromatogrammen dargestellt. (C) Gradient G6 wurde im Vergleich zum initialen Gradienten G1 an TiO₂ angereicherten HeLa-Zelllysaten getestet, da mit G6 die beste Trennung der Phosphopeptide erreicht wurde.

Der Einbau einer Stufe von 1 % auf 10 % B nach 20 min bei den Methoden G3-G6 führte zu einer deutlich früheren Elution von Casein. Besonders bei G6, einem flacheren 40 minütigen Gradienten von 10-35 % B (0,6 % pro min), konnte die Elution der spät eluierenden Peptide aufgefächert werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden Gradient G1 und G6 zur Fraktionierung von angereicherten Phosphopeptiden aus 5 mg HeLa-Verdau eingesetzt. Hierbei wurden zwei Aliquote, entsprechend einer Startmenge von etwa 200 μg , mittels HILIC-Gradient G1 bzw. G6 aufgetrennt. Fraktionen wurden nur zwischen 30 und 70 min und in kurzen Zeitabständen von 3 bis 5 min gesammelt (siehe Abbildung 4-6 C). Wie im Chromatogramm sichtbar, verteilte sich die Elution der Phosphopeptide durch den flacheren Gradienten G6 gleichmäßiger auf die einzelnen Fraktionen. Insgesamt konnten so 13 % mehr Phosphopeptide und 14 % mehr Phospho-PSM als mit dem initial verwendeten Gradienten G1 identifiziert werden. Da die Phosphopeptidanreicherung nicht mit dem optimierten TiO_2 -Verfahren IIc durchgeführt wurde, sind die absoluten Anzahlen an Phosphopeptiden (3872 statt 3424 Phosphopeptide) nur bedingt mit den vorherigen Messungen vergleichbar.

Zusammen mit dem zweistufigen Titandioxidprotokoll IIc wurde der optimierte HILIC-Gradient G6 im weiteren Verlauf der Arbeit für die Optimierung des Verdaus von Phosphoproteinen sowie zur Aufarbeitung der Proben von Patienten mit CLL eingesetzt.

4.2. Analyse und Optimierung des Verdaus von Phosphoproteinen

Ein wichtiger Schritt, dessen Bedeutung bei der Analyse von phosphorylierten Sequenzen mittels LC-MS oft unterschätzt wird, ist der vorausgehende Proteinverdau. Eine verringerte Effizienz des Verdaus kann dazu führen, dass Fehler bei der Quantifizierung von Phosphoproteinen auftreten. In der Literatur wurde u.a. der eingeschränkte Verdau von Sequenzen, wie K/R-X-pS/pT , beschrieben, die der Konsensussequenz von Proteinkinase A (PKA) ähneln [144].

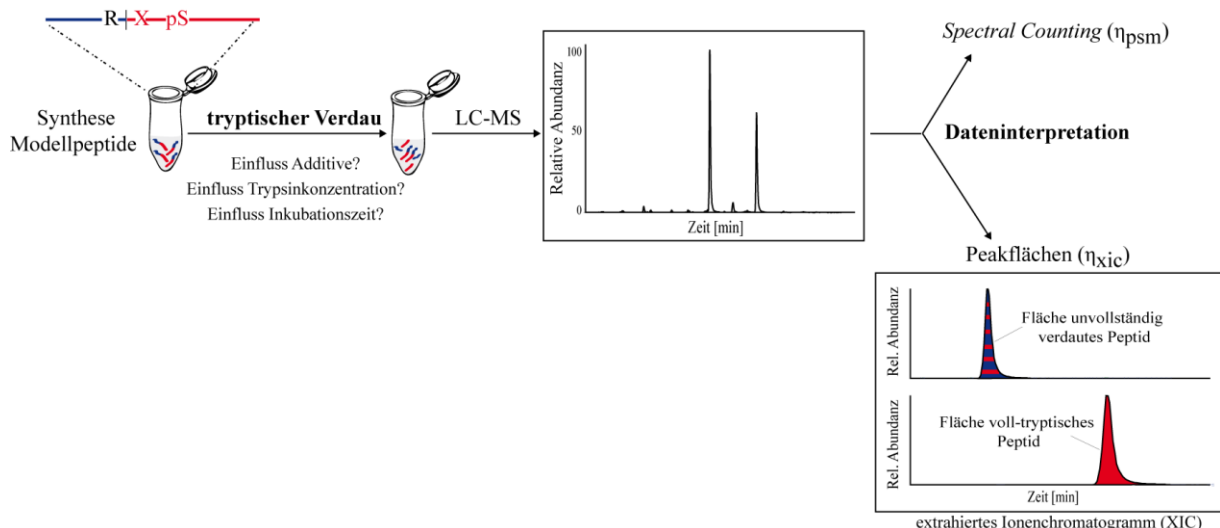


Abbildung 4-7: Schematische Darstellung des verwendeten Workflows. Anhand der synthetisierten Modellpeptide, die interne tryptische Schnittstellen aufweisen, wurden unterschiedliche Verdaubedingungen getestet. Die Analyse der Proben erfolgte mittels LC-MS und semi-quantitativer Datenauswertung, basierend auf *Spectral Counting* bzw. Integration der Peakflächen (mittels XICs).

Um den Einfluss von Phosphorylierungsstellen auf den tryptischen Verdau genauer zu untersuchen, wurden, basierend auf zwei Peptiden, die die PKA-Konsensussequenz enthalten, 19 Modellpeptide synthetisiert (siehe Tabelle 3-3). Innerhalb dieser Sequenzen befand sich eine phosphorylierte Aminosäure unterschiedlich weit von der tryptischen Schnittstelle entfernt. Das allgemeine Vorgehen ist in Abbildung 4-7 nochmal schematisch dargestellt.

Das Ziel dieser Studie war es, den Einfluss sowohl der Position als auch der Art der Phosphoaminosäure auf den Verdau zu evaluieren. Hierbei erfolgte eine relative Quantifizierung der Effizienz des Verdau anhand von zwei semi-quantitativen Verfahren, dem *spectral counting* (η_{psm}) sowie der Bestimmung der erhaltenen Peakflächen nach dem Verdau (η_{xic} , siehe Formeln 3.2.3.4). Es wurden jeweils das voll tryptische Peptid sowie die unvollständig verdaute Variante („*missed-cleavage*“), mit einer oder mehreren überlesenen Schnittstellen, betrachtet.

Als Standardverdaubedingung wurde 1 μg eines Modellpeptids mit einem Trypsin/Peptid-Verhältnis von 1:50 (w/w) in 50 mM ABC Puffer, pH 8, bei einer Inkubationsdauer von 16 h eingesetzt. Eine Übersicht der Verdaueffizienzen der analysierten synthetischen Peptide ist in Abbildung 4-8 dargestellt.

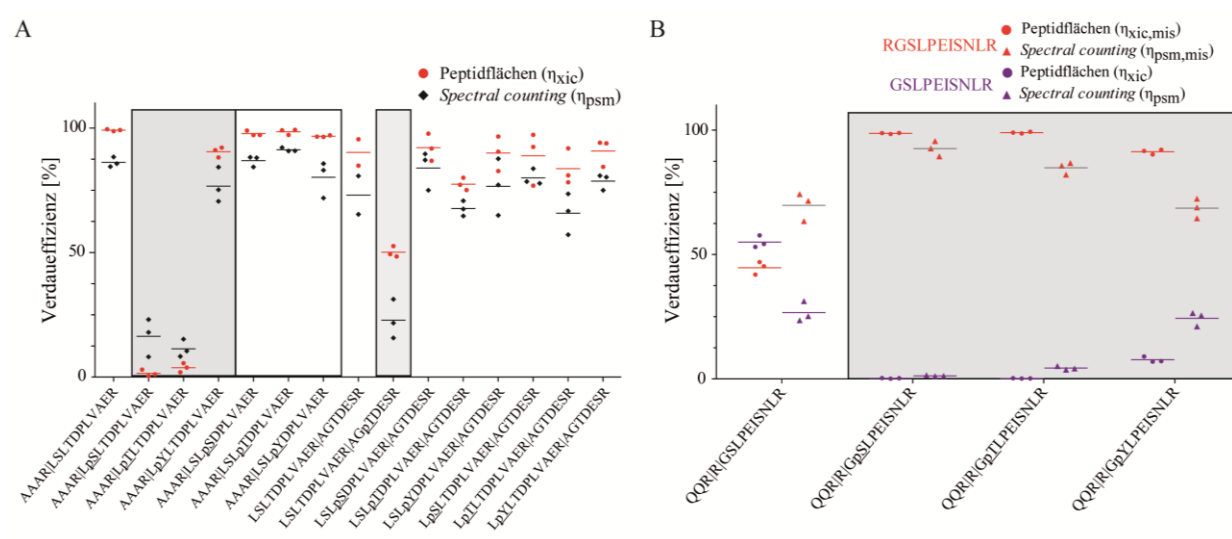


Abbildung 4-8: Verdaueffizienz der synthetischen Modellpeptide. Die Verdaueffizienz wurde über einen Vergleich der Anzahl an PSM (*Spectral counting*) sowie über einen Vergleich der Peakflächen (XICs) zwischen der voll tryptischen und unvollständig verdauten Variante des Peptids bestimmt. Die markierten Flächen dienen zur besseren Übersicht und weisen auf interessante Ergebnisse hin.

Die Experimente zeigten, dass Phosphoserin und Phosphothreonin in der Nähe der tryptischen Schnittstelle, wie bei den Peptiden AAAR|LpSLTDPLVAER und AAAR|LpTLTDPLVAER, den Verdau stark beeinflussen. Weniger als 17 % dieser Peptide konnten vollständig verdaut werden (siehe Abbildung 4-8 A). Der negative Einfluss der Phosphorylierung nahm an Position P3' ab (50 % Verdaueffizienz) und war bei einer weiteren Entfernung zur Schnittstelle (P4') nicht mehr nachweisbar.

Interessanterweise wurde der Verdau durch eine Phosphorylierung von Tyrosin an P2', wie in AAAR|LpYLTDPLVAER, kaum eingeschränkt. Die Verdaueffizienz lag hier bei >80 %.

Als Kontrolle wurden jeweils die nicht phosphorylierten Peptidvarianten mitgeführt, die nahezu vollständig (>90 % Effizienz) verdaut wurden. Zudem dienten weitere Sequenzen mit pSer, pThr bzw. pTyr in größerer Entfernung zur tryptischen Schnittstelle als Kontrollen.

Der Verdau einer unmodifizierten Sequenz mit zwei möglichen tryptischen Schnittstellen QQR|R|GSLPEISNLR erfolgte etwa zu gleichen Teilen zu R|GSLPEISNLR sowie zu der voll tryptischen Form GSLPEISNLR (siehe Abbildung 4-8 B). Hierbei ergaben die zwei Auswertestrategien leicht unterschiedliche Ergebnisse. Bei den phosphorylierten Varianten mit pSer bzw. pThr an P2' wurde zu mehr als 95 % die unvollständig geschnittene Form R|GXLPEISNLR bevorzugt und somit wurden weniger als 5 % der Peptidsequenzen vollständig tryptisch verdaut. Der Einfluss von pTyr an P2' führte ebenfalls zu einer Präferenz der entfernteren Schnittstelle (zu ~ 80 %), jedoch schwächer als bei pThr und pSer.

Anhand der durchgeführten Experimente konnte das Ausmaß der Beeinträchtigung des Verdau durch Phosphorylierungen quantitativ bestimmt werden. Die Verdaueffizienz hängt von mehreren Faktoren ab: (i) von der modifizierten Aminosäure, (ii) der Entfernung dieser Aminosäure zur tryptischen Schnittstelle sowie (iii) von der Umgebungssequenz, z. B. von weiteren Schnittstellen.

4.2.1. Einfluss verschiedener Verdaubedingungen

Um den Verdau der „resistenten“, d.h. zu weniger als 20 % voll tryptisch verdauten, Phosphopeptide zu verbessern, sollten im nächsten Schritt unterschiedliche Verdaubedingungen getestet werden. Hierzu wurde der Zusatz von organischen Lösungsmitteln zum Verdaupuffer sowie der Einfluss von steigenden Trypsinmengen auf die Verdaueffizienz untersucht. Die Ergebnisse beziehen sich auf den Flächenvergleich (η_{xic}) der Peptidvarianten, da diese Auswertung weniger durch chromatographische Faktoren wie Peakverbreiterung und Tailing beeinflusst wurde: die Fläche bleibt relativ konstant, während sich das *spectral counting* zum Teil erheblich verändert.

Für die Verdautests wurden ACN und TFE zu den Standardverdaubedingungen als organische Zusätze in einer finalen Konzentration von 10 % bzw. 5 % (v/v) hinzugegeben (siehe Abbildung 4-9). Diese geringen Konzentrationen der Additive hatten in vorausgehenden Experimenten keinen negativen Einfluss auf den tryptischen Verdau auf Proteinebene, während Konzentrationen >40 % ACN kritisch diskutiert werden [145].

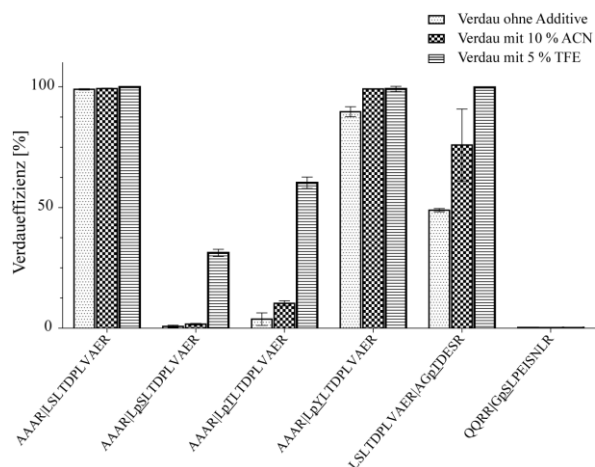


Abbildung 4-9: Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf den Phosphopeptidverdau. Der Verdau der „resistenten“ Phosphopeptide erfolgte unter Zugabe von 10 % ACN bzw. 5 % TFE (v/v) unter ansonsten Standardverdaubedingungen. Mit Ausnahme der Sequenz QQR|GpSLPEISNLR, konnte die Verdauereffizienz deutlich verbessert werden.

Obwohl auch mit 10 % ACN eine Verbesserung des Verdau der „resistenten“ Phosphopeptide erzielt werden konnte, führte erst eine Zugabe von 5 % TFE zu einer signifikanten Erhöhung der Verdauereffizienz auf 31 % bzw. 60 % für die Phosphopeptide AAAR|LpSLTDPLVAER und AAAR|LpTLTDPLVAER. Allerdings konnten beide Additive nicht den Verdau von QQR|GpSLPEISNLR in die vollständig verdaute Variante GpSLPEISNLR des Peptids positiv beeinflussen.

Zu einer deutlichen Verbesserung der Verdauereffizienz der „resistenten“ Phosphopeptide führte ebenfalls eine Erhöhung der Trypsinkonzentration, mit einem Trypsin/Peptid-Verhältnis von 1:20 (w/w) statt 1:50 (siehe Abbildung 4-10 A).

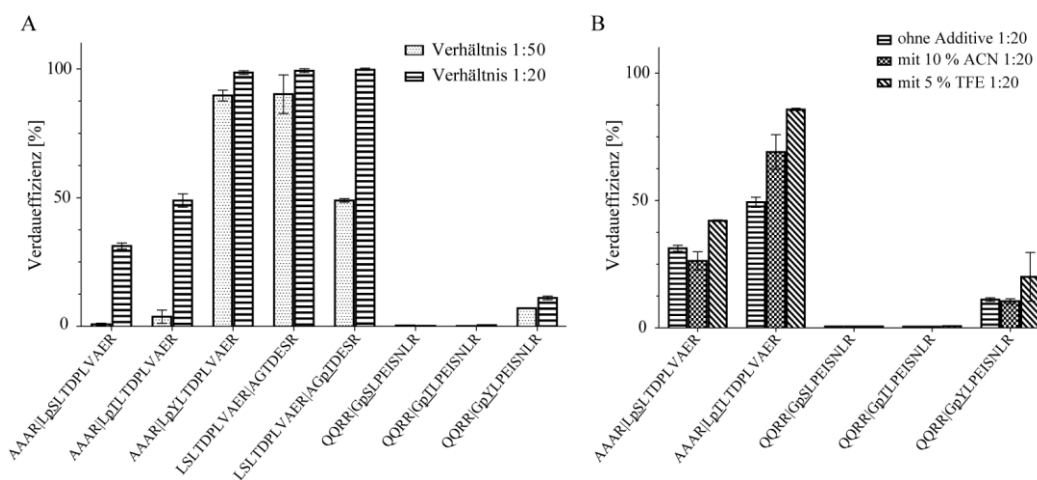


Abbildung 4-10: Vergleich der Verdauereffizienz bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen. (A) Verdauereffizienzen „resistenter“ Phosphopeptide bei unterschiedlichen Trypsinkonzentrationen, Trypsin/Peptid-Verhältnis 1:20 und 1:50 (w/w). (B) Einfluss von Additiven wie ACN und TFE auf den Verdau bei einem Verhältnis von 1:20 (w/w). Eine Kombination der höheren Trypsinkonzentration und 5 % TFE führte zu einem deutlich verbesserten Verdau der Einzelpeptide.

Daraufhin wurde eine Kombination aus der erhöhten Trypsinkonzentration, Trypsin/Peptid-Verhältnis von 1:20 (w/w), und organischen Additiven untersucht (siehe Abbildung 4-10 B). Die Phosphopeptide AAAR|LpSLTDPLVAER und AAAR|LpTLTDPLVAER konnten mit 5 % TFE-Zugabe zu 42 % bzw. 86 % zum jeweiligen voll tryptischen Peptid verdaut werden. Diese Verdaubedingungen führten zudem zu einer leichten Verschiebung der Präferenz von Trypsin für die Schnittstelle des Phosphopeptids QQR|R|GpSLPEISNLR. Zwar wurde immer noch die Schnittstelle in größerer Entfernung von der Phosphorylierung bevorzugt, aber zumindest für die Sequenz mit pTyr konnte die Umsetzung zur voll tryptischen Form von 7 % auf 15 % erhöht werden.

Der Einfluss der Inkubationszeit auf die Verdaueffizienz war hingegen nur gering. Nach einer Inkubation der „resistenten“ Peptide über 8 h bzw. 16 h konnte keine höhere Konzentration des voll tryptischen Peptids im Vergleich zu einer 4 h Inkubationszeit festgestellt werden. Aufgrund der einfachen Handhabbarkeit wurde bei allen Versuchen ein Verdau über Nacht, von 16 h, eingesetzt.

4.2.2. Beeinflussbarkeit von *large-scale* Phosphoproteomstudien

In weiteren Versuchen sollten die Erkenntnisse, die aus dem Verdau der Modellpeptide gewonnen werden konnten, auf *large-scale* Phosphoproteomstudien übertragen werden. Hierbei war neben der Effizienz des Verdaus entscheidend, ob dies die Sensitivität der Analyse beeinflusste und ob die unterschiedlichen Verdaubedingungen einen Einfluss auf die Quantifizierung und die Anreicherung von Phosphopeptiden hatten.

Als Proben wurden pro Trypsin/Peptid-Verhältnis (1:10, 1:20, 1:50 und 1:100 (w/w)) 100 µg Thrombozytenlysat in drei technischen Replikaten eingesetzt. Die Proben wurden tryptisch verdaut und die Phosphopeptide pro Verdaubedingung mittels des etablierten TiO₂-Protokolls nach Verfahren IIc angereicht. Über einen markierungsfreien Ansatz wurde die Gesamtanzahl an Phosphopeptiden sowie die Anzahl an Phospho-PSM (d.h. auf PSM mit Phosphorylierung) bestimmt und semi-quantitativ über eine Integration der Peakflächen in Proteome Discoverer ausgewertet. Bei einem Trypsin/Protein-Verhältnis von 1:50 konnte die höchste Anzahl an Phosphopeptiden, 1591 Phosphopeptide, identifiziert werden, während die meisten Phosphorylierungsstellen, 1351 insgesamt, bei einem Verhältnis von 1:20 (w/w) nachweisbar waren (siehe Abbildung 4-11 A). Bei allen Proben wurde eine relative Standardabweichung der Anzahl an identifizierten Phosphopeptiden zwischen den Replikaten von ≤5 % nachgewiesen.

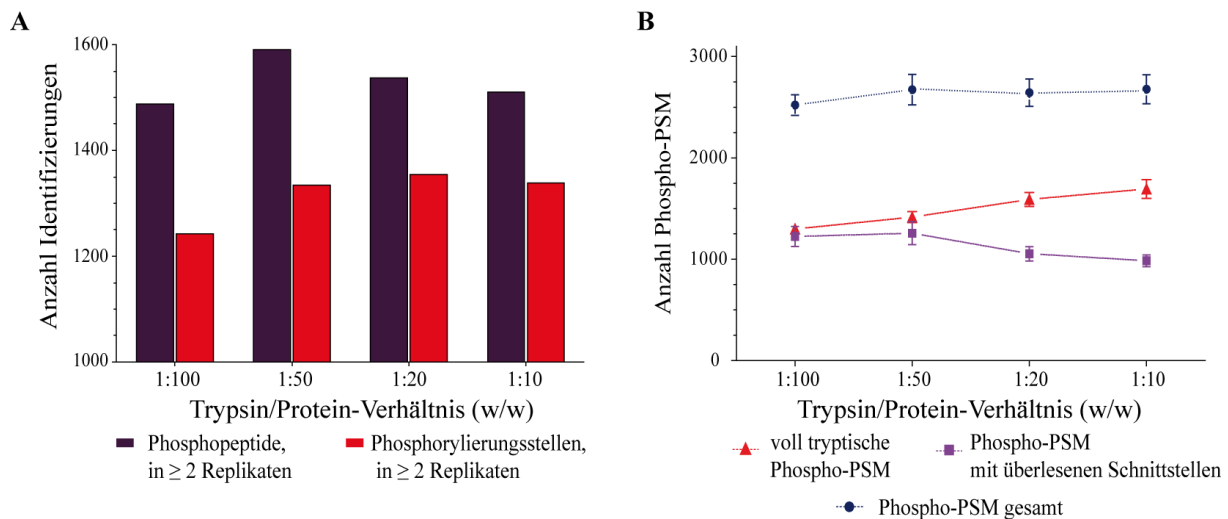


Abbildung 4-11: Einfluss der Trypsinkonzentration auf den Verdau einer komplexen Probe. (A) Vergleich der Phosphopeptide und Phosphorylierungsstellen, die mit den verschiedenen Trypsinkonzentrationen von 1:100 bis zu 1:10 (w/w) Trypsin/Protein-Verhältnis, identifiziert wurden. Berücksichtigt wurden Sequenzen, die in ≥ 2 Replikaten quantifiziert wurden (je 75 μg angereichert). (B) Die Anzahl voll tryptischer und unvollständig verdauter Sequenzen wurden auf Phospho-PSM Ebene ausgewertet.

Im Vergleich zu einem Verdau mit einem Trypsin/Peptid-Verhältnis von 1:100 konnten mit einem Verhältnis von 1:20 (w/w) 9 % mehr Phosphorylierungsstellen (1351 statt 1243) quantifiziert werden, während die Anzahl an Phosphopeptiden mit höheren Trypsinkonzentrationen abnahm. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass bei einem Verhältnis von 1:50 und insbesondere 1:100 (w/w) eine deutlich höhere Zahl an Phosphopeptiden mit überlesenen Schnittstellen vorlag, die keinen zusätzlichen Informationsgehalt besitzen und die quantitative Auswertung verzerren können. Diese Annahme konnte durch einen Vergleich der Anzahl an voll tryptischen und unvollständig verdauten Phospho-PSM bestätigt werden. Die Anzahl an voll tryptischen Phospho-PSM nahm mit steigendem Trypsin/Peptid-Verhältnis in etwa gleichem Maße zu wie die unvollständig verdauten Phospho-PSM abnahmen (siehe Abbildung 4-11 B). Auf die Gesamtzahl an Phosphopeptiden gesehen waren die Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Verdaubedingungen geringer als erwartet.

Um den direkten Einfluss auf die Quantifizierung von Phosphopeptiden in einer komplexen Probe zu ermitteln, wurden daher die relativen Abundanzen einzelner Peptide nach iTRAQ-Markierung untersucht. Hierzu wurden die vier Verdaubedingungen, Trypsin/Peptid-Verhältnisse von 1:10, 1:20, 1:50 bzw. 1:100 (w/w), jeweils mit einem iTRAQ-Reagenz markiert und mittels TiO_2 angereichert. Insgesamt konnten ~ 1300 Phosphopeptide quantifiziert werden. Auf Basis der Summe der Reporterionenintensitäten der voll tryptischen Phospho-PSM wurde eine gesteigerte Sensitivität des Verfahrens bei Verwendung eines Trypsin/Peptid-Verhältnisses von 1:10 bzw. 1:20 gegenüber 1:50 (w/w) um mehr als 10 % nachgewiesen, was mit dem markierungsfreien Ansatz vergleichbar war.

Der Vergleich der relativen Abundanzen einzelner Phosphopeptide zeigte jedoch noch deutlichere Veränderungen, exemplarisch gezeigt an der Sequenz AAAR|LpSLTDPLVAER des *Platelet Glycoproteins 1b* (P13224, siehe Abbildung 4-12).

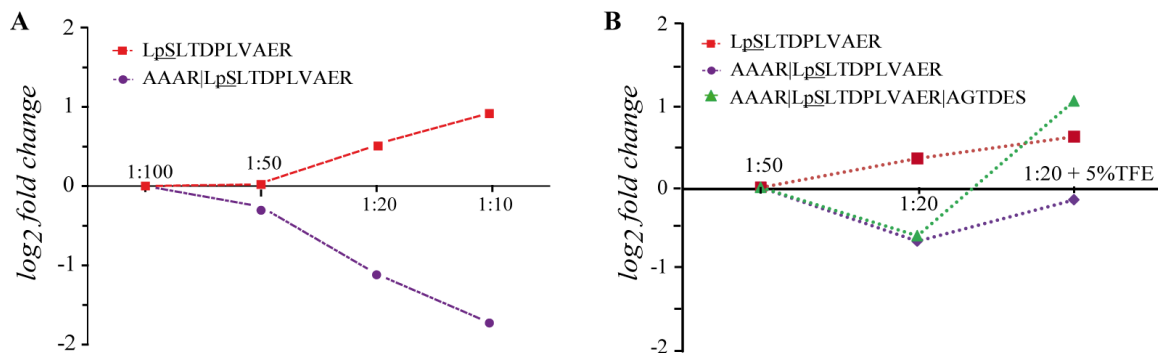


Abbildung 4-12: Einfluss der Verdaubedingungen auf die Quantifizierung von Phosphopeptiden in iTRAQ markierten Proben. Der Vergleich erfolgte anhand der relativen Abundanzen einzelner Phosphopeptide zwischen den (A) verschiedenen Trypsinkonzentrationen, bezogen auf die Abundanzen bei 1:100 und (B) nach Zugabe des Additivs TFE, bezogen auf die Abundanzen bei 1:50 (w/w). Exemplarisch gezeigt an dem Verdau der Peptidsequenz AAAR|LpSLTDPLVAER, in den TiO₂ angereicherten Thrombozytenproben.

Es ergaben sich signifikante Unterschiede in den Abundanzen des voll tryptischen Phosphopeptids LpSLTDPLVAER zwischen den verschiedenen Verdaubedingungen. Bei der Verwendung eines Trypsin/Peptid-Verhältnisses von 1:20 anstatt 1:50 (w/w), welches in vielen *large-scale* Analysen verwendet wird, konnte eine 1,5-fache Erhöhung der Abundanz dieses Peptids erreicht werden, mit einem Verhältnis von 1:10 sogar eine 2-fache Erhöhung. Zudem wurde das Trypsin/Peptid-Verhältnis von 1:20 (w/w) mit 5 % (v/v) TFE im Verdau puffer kombiniert. Im Vergleich zu den mitgeführten Proben ohne Additiv im Verdau puffer, konnte lediglich ein geringer Anstieg des Levels an LpSLTDPLVAER (1,2-fache Erhöhung) nachgewiesen werden. Interessant war hierbei jedoch das Verhalten des unvollständig verdauten Peptids AAAR|LpSLTDPLVAER, welches nach Zugabe von 5 % TFE statt der erwarteten Abnahme eine 1,4-fache Zunahme zeigte. Ebenso konnte unter diesen Verdaubedingungen eine Verdreifachung des Phosphopeptids AAAR|LpSLTDPLVAER|AGTDES mit zwei überlesenen Schnittstellen ermittelt werden, sodass eventuell auf Proteinebene insgesamt eine weitere Verbesserung des Verdau vorliegt.

Obwohl die Zugabe von 5 % TFE die Verdaueffizienz von Trypsin in den durchgeführten Versuchen auch auf Proteomebene leicht erhöhte, ist der Einsatz von 5 % TFE bei der Anreicherung von Phosphopeptiden mittels TiO₂ kritisch zu sehen. Bei einem weiteren markierungsfreien Ansatz (100 µg Thrombozyten, Duplikate) wurden mit 5 % TFE im Verdau puffer durchschnittlich 10 % weniger Phosphopeptide nach TiO₂-Anreicherung identifiziert als ohne Additiv, sodass davon auszugehen ist, dass TFE einen negativen Einfluss auf die Bindung der Peptide an die Titandioxidpartikel hat. Dieser

Effekt war den iTRAQ-Experimenten aufgrund der Vereinigung der Proben vor der Anreicherung nicht sichtbar bzw. wirkte sich auf alle enthaltenen Proben gleich aus.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde im weiteren Verlauf der Arbeit ein Trypsin/Protein-Verhältnis von 1:20 (w/w) in 50 mM ABC bei pH 8 (bei iTRAQ-Experimenten 50 mM TEAB, pH 8) und eine Inkubationszeit von 16 h eingesetzt. Auf den Einsatz einer höheren Trypsinkonzentration, wie eines Trypsin/Peptid-Verhältnisses von 1:10 (w/w), wurde, vor allem aufgrund eines erhöhten Risikos für das Auftreten von semitryptischen oder nicht-tryptischen Peptiden, verzichtet [46].

4.3. Analyse des Phosphoproteoms von CLL-Zellen

Ziel dieses Projekts war es, das optimierte Verfahren zum Verdau von Phosphoproteinen mit anschließender TiO₂-HILIC-Anreicherung der phosphorylierten Peptide zur Untersuchung von Unterschieden und Gemeinsamkeiten in den Phosphorylierungsmustern von B- und CLL-Zellen einzusetzen, die aus Blutproben von Patienten aufgereinigt wurden (durchgeführt am Universitätsklinikum Köln, siehe Kapitel 3.2.1). Hierbei wurden die Patienten basierend auf einem prognostischem Marker, dem IgVH-Mutationsstatus, in zwei Gruppen geteilt: ein mIgVH-Genstatus spricht für einen milden Verlauf der Erkrankung, während ein uIgVH-Genstatus mit einer aggressiven Form der CLL korreliert. Die Phosphorylierungen wurden im nativen Zustand, nach Aktivierung durch anti-IgM und nach Zugabe des Inhibitors Ibrutinib untersucht, der die Bruton-Tyrosinkinase und damit eine zentrale Tyrosinkinase des BCR-Signalwegs hemmt. Die Stimulation des B-Zellrezeptors mittels anti-IgM Immunobeads sollte den natürlichen Zustand der B- und CLL-Zellen im menschlichen Körper nachahmen.

4.3.1. Initiale Experimente

4.3.1.1. Optimierung der Probenaufarbeitung von B- und CLL-Zellen

Um eine initiale Aktivierung der B- und CLL-Zellen zu verhindern, wurden die Zellen mittels negativer Selektion isoliert (siehe Kapitel 3.2.1). Der anschließende Zellaufschluss wurde zunächst nach dem Standardprotokoll in 1 % (w/v) SDS-Lysepuffer durchgeführt, was jedoch zu keinem vollständigen Aufschluss der Zellen führte. Eine effiziente Lyse konnte mittels RIPA-Puffer und Zusatz von 1 % SDS (w/v) erreicht werden. Allerdings zeigte sich, dass die Umpufferung auf den gewählten TEAB-Verdaupuffer, die durch das FASP-Protokoll erzielt werden sollte, nicht ohne Rückstände von Detergenzien möglich war. Auch nach C18-Entsorgung enthielten die Proben noch Detergenzien, die nicht mit der anschließenden RP-LC Messung kompatibel waren. Daher wurden zusätzlich zu den vorhandenen Waschschritten zwei Waschschrritte mit 20 % ACN bzw. 50 % ACN zum FASP-Protokoll hinzugefügt und parallel eine Aufarbeitung der gleichen Proben mittels Ethanol-fällung getestet (siehe Abbildung 4-13).

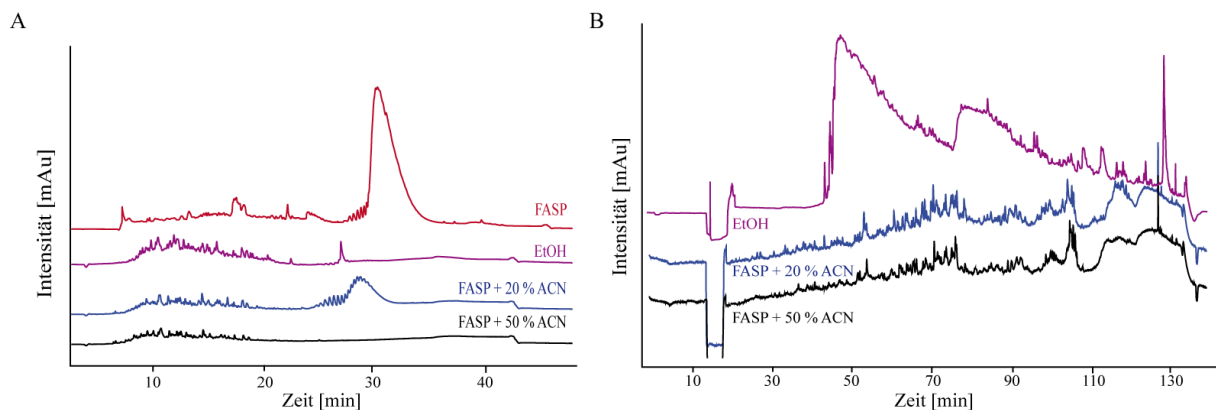


Abbildung 4-13: Verdau- und Anreicherungskontrollen aus der Aufarbeitung der CLL-Zellen. (A) UV-Chromatogramme der monolithischen Trennung nach FASP-Verdau bzw. Verdau nach Ethanol-fällung (EtOH); Detergenzien-Signal ~30 min. (B) LC-Auftrennung nach TiO₂-Phosphopeptidanreicherung. Ein Verdau nach Ethanol-fällung war, im Gegensatz zu den FASP-Ansätzen mit 20 % bzw. 50 % ACN-Waschschritten, nicht für die Aufarbeitung der Proben geeignet.

Sowohl mittels Ethanol-fällung als auch mit den zusätzlichen Waschschritten bei FASP konnte eine Abreicherung der Detergenzien und damit eine verbesserte Umpufferung erreicht werden. Lediglich bei der Verwendung von 20 % ACN konnten noch Rückstände von Detergens beobachtet werden, die aber die Ergebnisse der Messung und die Lebensdauer der LC-Säulen nicht beeinträchtigten. Es stellte sich jedoch heraus, dass bei einer darauf folgenden Phosphopeptidanreicherung große Unterschiede in den gemessenen angereicherten Proben sowohl im UV-Chromatogramm (siehe Abbildung 4-13 B) als auch in der anschließenden Datenbanksuche nachweisbar waren. Bei der Verwendung von 20 % ACN als Waschlösung konnten 12 % mehr Phosphopeptidsequenzen (~1600 Phosphopeptide mit einer Spezifität ≥ 75 %, 90 μg CLL-Probe), als mit 50 % ACN angereichert werden, was wahrscheinlich auf die eingeschränkte Kompatibilität der Filter mit ACN-Konzentrationen >20 % zurückzuführen ist. Nach Ethanol-fällung zeigte das UV-Chromatogramm eine stark verschobene Basislinie sowie deutlich niedrigere Signalintensitäten. Insgesamt wurden mehr als 20 % weniger Phosphopeptide identifiziert als mit den modifizierten FASP-Ansätzen. Daher wurde in den weiterführenden Experimenten das modifizierte FASP-Protokoll mit 20 % ACN Waschschritten für den Verdau der CLL-Proben eingesetzt.

4.3.1.2. Initialer Proteomvergleich von B- und CLL-Zellen

Ein erster Vergleich des Proteoms von Zellen von CLL-Patienten der zwei Patientengruppen sowie B-Zellen von gesunden Spendern wurde anhand von gepoolten Patientenproben durchgeführt (siehe Tabelle 3-8). Hierbei wurden pro Gruppe die Zellen von mindestens drei Spendern aufgrund geringer verfügbarer Probenmengen der B-Zellen gepoolt. Neben den unbehandelten Zellen (nativer Zustand) lagen anti-IgM stimulierte Zellen, die für 20 min in Zellkultur stimuliert wurden, vor. Aufgrund der kurzen Stimulationsdauer wurde keine Änderung auf Proteomebene nach IgM-Stimulus erwartet.

Ziel dieses Versuches war es zunächst auf Proteinebene die Anwendbarkeit der iTRAQ-basierten Quantifizierung für diesen Zelltyp zu testen und bekannte prognostische Marker zu detektieren sowie zu quantifizieren. Um die Sensitivität der Messung zu erhöhen, wurde vor der nano-HPLC Messung eine pH 6-Fraktionierung durchgeführt. Insgesamt konnten so aus 30 µg Startmaterial 4550 Proteine, mit mindestens zwei unigenen Peptiden, quantifiziert werden.

Nach IgM-Stimulation wurden lediglich 10 Proteine als differentiell exprimiert ($\geq 1,5$ -fache Regulation) detektiert. Unter diesen Proteinen waren vier Isoformen des Histons H1 (Histon H1.2, H1.3, H1.4 und H1.5), die jeweils eine starke Abnahme des Proteinlevels nach IgM-Stimulation aufwiesen ($\sim \downarrow -1,7$).

Ein Vergleich der relativen Abundanzen der nativen Proteinlevel zeigte, dass zwischen den CLL-Patientengruppen lediglich 3 % aller Proteine (144 Proteine) differentiell waren, während 14 % (622 Proteine) eine Regulation im Vergleich von nativen B-Zellen und CLL-Zellen (mIgVH und/oder uIgVH) aufwiesen. Auffällig war die geringere Expression von Proteinen in CLL-Zellen, die an der B-Zellaktivierung beteiligt sind, wie CD79A (*B-cell antigen receptor complex-associated protein alpha chain*, P11912), CD180 (Q99467) oder die Serin/Threonin-Phosphatase PPP3CA (Q08209). Mittels Gene Ontology Annotation konnte unter den 622 differentiellen Proteinen eine signifikante Anreicherung des biologischen Prozesses „Zellaktivierung“ bei 37 Proteinen (p-Wert $1,53 \cdot 10^{-17}$) ermittelt werden.

In der Literatur beschriebene Proteinmarker, die zur Differenzierung der milden von der aggressiven Verlaufsform der CLL dienen, konnten mittels iTRAQ-basierter Quantifizierung bestätigt werden. Ein wichtiger Surrogatmarker, das Expressionslevel der Tyrosinkinase ZAP-70 (P43403) war in den Patienten der uIgVH-Gruppe stark erhöht ($\uparrow 1,64$). Auffällig war zudem das erhöhte Level von Septin-10 (Q9P0V9, $\uparrow 2,11$) in der gleichen Gruppe. Auf Basis von Genexpressionsprofilen konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von Septin-10 mit dem uIgVH-Genstatus korreliert [146]. Diese Ergebnisse zeigen, dass trotz der hohen Variabilität der Proteinexpression in CLL-Patienten ein globaler LC-MS basierter Ansatz Veränderungen der Abundanzen sensitiv nachweisen kann.

Da gesunde B-Zellen von freiwilligen Spendern nicht in ausreichender Menge verfügbar waren, wurde in folgenden Experimenten der Vergleich auf die CLL-Zellen beschränkt.

4.3.2. Quantifizierung der Protein- und Phosphoproteinlevel

Zur Quantifizierung der Phosphorylierungsmuster in CLL-Zellen wurden jeweils drei Patienten mit dem Genstatus mIgVH sowie drei mit dem Status uIgVH untersucht. Hierbei erfolgte die Inkubation der CLL-Zellen in Zellkultur zunächst für 3 min mit dem spezifischen Inhibitor der Bruton-Tyrosinkinase Ibrutinib (Ibr), bevor ein Teil der Zellen unbehandelt weiter verarbeitet (nativer Zustand) und ein anderer Teil für 20 min mit anti-IgM-Immunobeads (IgM) inkubiert wurde. Pro Patient und Probenbehandlung wurden 120 µg Protein verdaut. Nach dem Verdau erfolgte die Stabil-Isotopenmarkierung mittels iTRAQ-Reagenzien sowie die Phosphopeptidanreicherung mittels TiO_2 nach dem Verfahren IIc und

HILIC-Fraktionierung. Aufgrund der großen Anzahl an Proben wurden drei iTRAQ-Experimente durchgeführt (siehe Schema der Experimente Tabelle 3-9) und die Rohdaten anschließend vereint. Aus diesen umfassenden Daten war ein Vergleich der basalen Phosphorylierung, der Phosphorylierung nach IgM-Stimulus sowie nach Zugabe des BTK-Inhibitors möglich.

Im Durchschnitt konnten in den drei iTRAQ-Experimenten 10.172 ± 1213 Phosphopeptidsequenzen mit einem phosphoRS-Wert ≥ 90 % quantifiziert werden. Für die Vergleiche der Phosphorylierungsmuster wurden jedoch nur die 9184 Phosphopeptidsequenzen herangezogen, die in mindestens zwei der drei iTRAQ-Experimente quantifiziert werden konnten. Diese Phosphopeptidsequenzen stammten aus 2854 Phosphoproteinen.

Auf der Ebene der Phosphoproteine konnten 55 % der Proteine (2198 Phosphoproteine) in allen drei iTRAQ-Experimenten quantifiziert werden (siehe Abbildung 4-14)

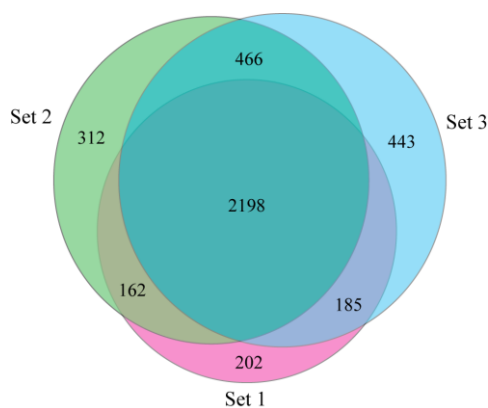


Abbildung 4-14: Schnittmenge der quantifizierten Phosphoproteine aus den drei iTRAQ-Experimenten. Der Vergleich erfolgte basierend auf den identifizierten UniProt *Protein Accessions* pro Datensatz.

Zusätzlich wurde ein kleiner Teil der nativen, iTRAQ markierten Patientenproben (5 μ g pro Patient) für die Bestimmung der globalen Proteinlevel herangezogen. Hierbei wurden 3466 Proteine mit jeweils mindestens zwei unique Peptiden quantifiziert, von denen 38 zwischen den Patientengruppen differentiell waren (*moderated t-test*, Regulation \log_2 fold change $> (MD+3 \cdot SD)$, $p \leq 0,05$). Diese globale Messung bestätigte die oben genannten Ergebnisse des initialen Proteomvergleichs: sowohl ZAP-70 ($\uparrow 1,34$) als auch Septin-10 ($\uparrow 1,29$) zeigten signifikant erhöhte Proteinlevel in der uIgVH-Gruppe. Darüber hinaus fiel das Protein MARCKS (*Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*, P29966) auf, welches ein stark reduziertes Expressionslevel in uIgVH-Patienten aufwies ($\downarrow -2,42$). Da ein Zusammenhang zwischen der Proteinexpression von MARKCS und dem IgVH-Genstatus in CLL nicht bekannt war, wurden Western Blot Analysen von einem größeren Patientenkollektiv ($n=45$) durchgeführt. Eine anschließende semi-quantitative Auswertung der Western Blots über die Stärke der detektierten Proteinbanden bestätigte, dass eine signifikant verringerte Expression von MARCKS in Patienten der uIgVH-Gruppe vorlag (siehe Abbildung 4-15).

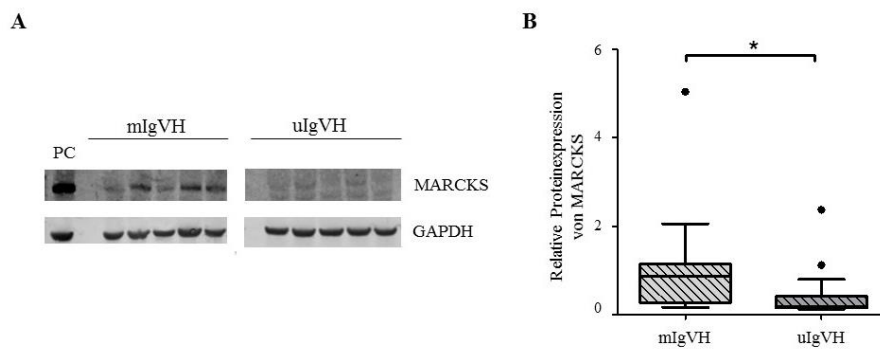


Abbildung 4-15: Validierung der Proteinexpressionslevel in CLL-Patienten mittels Western Blot. (A) Exemplarisch sind die Western Blots von jeweils fünf Patienten pro Gruppe dargestellt (insgesamt n=45). (B) Bei den 45 untersuchten Patienten konnten signifikante Unterschiede des Proteinlevels von MARCKS in Abhängigkeit von ihrem IgVH-Genstatus nachgewiesen werden.

4.3.2.1. Quantifizierung der basalen Phosphoproteinlevel

Zur Quantifizierung der basalen Phosphorylierungsmuster wurden in diesem Versuchsteil nur die Peptidsequenzen verglichen, die im nativen Zustand der CLL-Zellen (ohne Stimulation mit anti-IgM oder Zugabe von Ibrutinib) eine Phosphorylierung aufwiesen. Über eine statistische Analyse mittels *moderated t-test* (siehe auch 3.2.8.2) konnten 129 Phosphopeptidsequenzen als differentiell zwischen uIgVH- und mIgVH-Patienten nachgewiesen werden (siehe Anhang Tabelle 12-1). Die Regulationsfaktoren der einzelnen Phosphopeptidsequenzen (\log_2 fold change) sind in Abbildung 4-16 gegen die berechnete Signifikanz ($-\log_{10}$ p-value) aufgetragen.

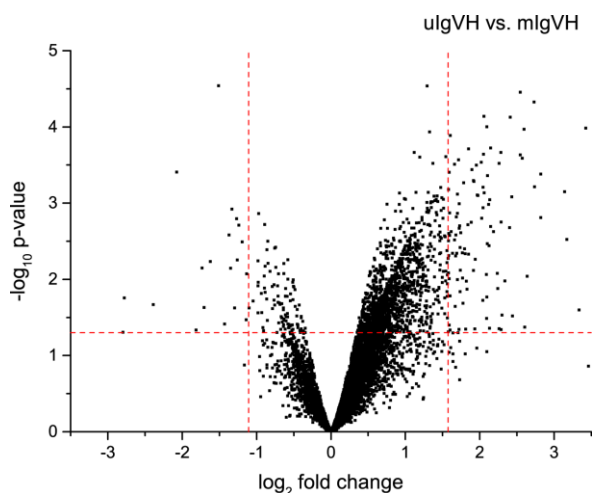


Abbildung 4-16: Vergleich der basalen Phosphorylierung zwischen uIgVH und mIgVH CLL-Patienten. Die gestrichelten Linien geben die Schwellenwerte für eine signifikante Regulation an: $p \leq 0,05$ sowie \log_2 fold change $> (MD + 3 \cdot SD)$.

Auffallend war, dass 108 der 129 differentiellen Phosphopeptidsequenzen eine verstärkte basale Phosphorylierung bei Patienten der uIgVH-Gruppe zeigten. Unter diesen befanden sich die Phosphorylierungsstellen mehrerer Kinasen, wie die der Serin/Threonin-Proteinkinasen PAK2 (S20 ↑2,09; S55 ↑2,64; S152 ↑2,29, Q13177) und MAP3K1 (S10 ↑2,15, Q13233) sowie der Tyrosin-Proteinkinase LYN (Y32 ↑2,02, P07948). Allerdings konnten mittels KEGG-Signalweg-Analyse keine signifikant angereicherten Signalwege bestimmt werden.

4.3.2.2. Quantifizierung der Phosphoproteinlevel nach IgM-Stimulation

Um die isolierten CLL-Zellen in Zellkultur ähnlichen Bedingungen auszusetzen wie im menschlichen Körper, wurden anti-IgM Immuno-beads zur Nachahmung der Antigenbindung an den BCR eingesetzt. Die veränderten Phosphorylierungslevel nach IgM-Stimulation wurden mit denen der unbehandelten, nativen CLL-Zellen verglichen (IgM vs. nat). Obwohl eine Vielzahl an Proteinen nach IgM-Stimulation eine erhöhte Phosphorylierung aufwies, konnten nur 94 Phosphopeptidsequenzen in Patienten der uIgVH-Gruppe und 37 in der mIgVH-Gruppe als differentiell nachgewiesen werden (siehe Anhang Tabelle 12-2 und Tabelle 12-3). Unter den regulierten 94 Phosphopeptiden der uIgVH-Gruppe wiesen 79 Sequenzen eine verstärkte Phosphorylierung auf, bei der mIgVH Gruppe 33 von 37 (siehe Abbildung 4-17 A und B).

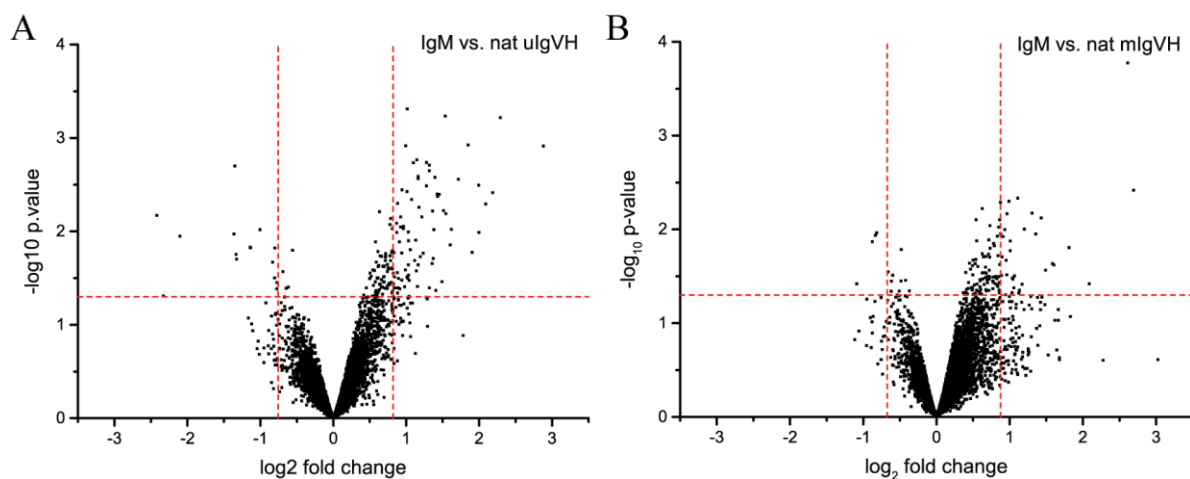


Abbildung 4-17: Vergleich der Phosphorylierungslevel nach IgM-Stimulation. Der Vergleich erfolgte innerhalb (A) der uIgVH- bzw. (B) der mIgVH-Patientengruppe zwischen anti-IgM stimulierten und nativen Zellen (IgM vs. nat). Die gestrichelten Linien geben die Schwellenwerte für eine signifikante Regulation an: $p \leq 0,05$ sowie $\log_2 \text{fold change} > (\text{MD} + 3 \cdot \text{SD})$.

Mittels KEGG-Signalweg-Analysen, in die alle differentiellen Phosphoproteine, unabhängig von der Patientengruppe, einbezogen wurden, konnten das Spliceosom, die Fc- γ -Rezeptor vermittelte Phagozytose, der BCR- sowie der MAPK-Signalweg als angereicherte Signalprozesse bestimmt werden (siehe Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: Signifikant angereicherte Signalprozesse aller nach IgM-Stimulation signifikant veränderter Phosphoproteine gemäß KEGG-Signalweg-Analyse. Die Ergebnisse basieren auf Unterschieden zwischen und innerhalb der Patientengruppen. 154 Protein-IDs; Schwellenwert KEGG: p-Wert $\leq 0,05$.

Angereicherte Signalwege	zugeordnete Proteine	p-Wert
Spliceosom	7 (4,5 %)	$1,20 \cdot 10^{-3}$
Fc- γ R-vermittelte Phagozytose	5 (3,2 %)	$1,27 \cdot 10^{-2}$
BCR-Signalweg	4 (2,6 %)	$3,50 \cdot 10^{-2}$
MAPK-Signalweg	7 (4,5 %)	$4,16 \cdot 10^{-2}$

Basierend auf der Annahme, dass mittels IgM-Stimulation zunächst eine Aktivierung des BCR-Signalwegs erfolgt, wurden Proteine dieses Signalwegs näher betrachtet. In beiden Patientengruppen konnte eine verstärkte Phosphorylierung der zentralen Tyrosinproteinkinase SYK (P43405) an S297 ($\sim \uparrow 1,3$) des BCR nachgewiesen werden. SYK bindet an phosphorylierte, Rezeptor-assoziierte Ketten des B-Zellrezeptors und stellt so eines der ersten Proteine der BCR-Signalkaskade dar. Die Erhöhung der Phosphorylierung an S297 stimmte mit Literaturangaben überein, in denen ein Anstieg der Phosphorylierung an dieser Aminosäure fünf Minuten nach BCR-Stimulation in B-Zellen nachgewiesen werden konnte [147]. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Stimulation des BCR erfolgreich war und somit eine Aktivierung der Zellen vorlag.

Interessanterweise wiesen die Aminosäuren Y32, Y306 und Y316 der Tyrosinkinase LYN (P07948), die an der Phosphorylierung des BCR und zusammen mit SYK an der initialen Signalweiterleitung im BCR-Signalweg beteiligt ist, in zwei der drei Patienten der uIgVH-Gruppe eine verringerte Phosphorylierung auf. Aufgrund der Heterogenität innerhalb der Patientengruppe wurde diese Veränderung nicht als signifikant identifiziert (p-Wert $\sim 0,12$), allerdings deutet dies auf eine unerwartete Reaktion der CLL-Zellen von uIgVH-Patienten nach Aktivierung hin, die in mIgVH-Patienten nicht zu beobachten war.

Im Hinblick auf MARCKS konnte in Patienten mit mIgVH-Status nach IgM-Stimulation eine Zunahme der Phosphorylierung an S170 ($\uparrow 0,83$, p-Wert 0,01) identifiziert werden. Die Phosphorylierung in Patienten der uIgVH-Gruppe nahm an dieser Aminosäure nicht zu.

Die erwartete hohe Heterogenität der CLL-Patienten erschwerte die statistische Auswertung der Proben und führte zu insgesamt hohen Signifikanzwerten.

4.3.2.3. Quantifizierung der Phosphoproteinlevel nach Zugabe des Kinaseinhibitors Ibrutinib

Zur Untersuchung der spezifischen Effekte von Ibrutinib auf die Phosphorylierungsmuster von Proteinen, die Substrate von BTK darstellen oder *downstream* von BTK im BCR-Signalweg liegen, wurde ein Vergleich mit stimulierten Zellen vorgenommen (IgM-Ibr vs. IgM).

Bei den Patienten der uIgVH-Gruppe konnten 37 Phosphopeptidsequenzen als differentiell bestimmt werden, bei der mIgVH-Gruppe lediglich 11 (siehe Anhang Tabelle 12-4 und Tabelle 12-5). Auffällig war, dass die signifikant differentiellen Phosphopeptidsequenzen der uIgVH-Patienten alle eine verringerte Phosphorylierung aufwiesen (siehe Abbildung 4-18).

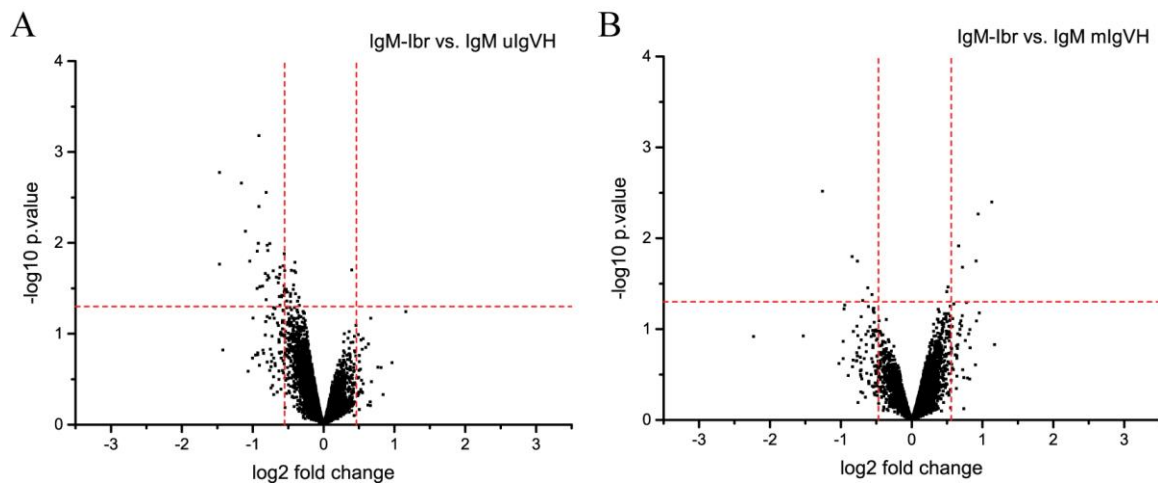


Abbildung 4-18: Vergleich der Phosphorylierungslevel nach Zugabe des BTK-Inhibitors Ibrutinib und anschließender Stimulation der Zellen mit anti-IgM. (A) Vergleich der Änderung der Phosphorylierungen innerhalb der Patienten der uIgVH-Gruppe bzw. (B) der mIgVH-Gruppe (IgM-Ibr vs. IgM). Die gestrichelten Linien geben die Schwellenwerte für eine signifikante Regulation an: $p \leq 0,05$ sowie \log_2 fold change $> (MD + 3 \cdot SD)$.

Bei einem Vergleich der mit Ibrutinib behandelten Zellen nach Stimulation mit reinen IgM-stimulierten Zellen konnten keine signifikanten Veränderungen in den Phosphorylierungsleveln von *upstream* von BTK gelegenen Proteinen, wie z. B. SYK und LYN, festgestellt werden. Im Gegensatz dazu gab es jedoch einige interessante Veränderungen an weiter *downstream* gelegenen Proteinen: In beiden Patientengruppen konnte eine signifikant verringerte Phosphorylierung von BCL2L11 (*Bcl-2-like protein 11*, O43521, $\sim \downarrow -1,2$), auch bekannt als BIM, an S77 quantifiziert werden. Zudem lag in Zellen mit uIgVH-Genstatus eine geringe Phosphorylierung an S656 in PIK3AP1 (*Phosphoinositide 3-kinase adapter protein 1*, Q6ZUJ8, $\downarrow -0,91$) nach Ibr-Zugabe vor.

Bei einem Vergleich der Phosphorylierungslevel, die sich zwischen den Patientengruppen unterschiedlich verhielten, fiel erneut die Phosphorylierung an S170 in MARCKS auf, die in Patienten der mIgVH-Gruppe signifikant verringert ($\downarrow -0,84$), in den uIgVH-Patienten nach Zugabe von Ibrutinib verstärkt, jedoch nicht signifikant verändert vorlag ($\uparrow 0,67$, p-Wert 0,07).

Die Untersuchung der Phosphorylierungsmuster sowohl innerhalb einer Patientengruppe als auch zwischen den beiden Gruppen zeigte eine sehr spezifische Wirkweise des Kinaseinhibitors Ibrutinib. Nur wenige Proteine wiesen eine statistisch signifikante Änderung ihres Phosphorylierungslevels auf. Aufgrund der geringen Anzahl an identifizierten differentiellen Phosphoproteinen, die auf die Ibrutinib-Behandlung ansprachen, war die Suche nach angereicherten Signalwegen mittels Datenbankabgleich

nicht sinnvoll. Ein erster Einblick in die übergeordneten Prozesse konnte jedoch anhand der Vorhersage der beteiligten Kinasen gewonnen werden (siehe Kapitel 5.3.2).

4.4. Nachweis von Phosphohistidin

Die Rolle von N-Phosphorylierungen in biologischen Systemen ist weniger gut untersucht als die der O-Phosphorylierungen. Ein Grund für den Mangel an Informationen stellt die Säureinstabilität der P-N Bindung dar, die den Nachweis mittels der in dieser Arbeit bereits beschriebenen LC-MS basierten Strategien einschränkt.

Ziel dieser Arbeit war es daher alternative LC-MS basierte Techniken zum Nachweis von Phosphohistidin zu etablieren. Hierfür war die Anpassung der Bedingungen während der Probenvorbereitung und chromatographischen Trennung entscheidend, die anhand von chemisch phosphorylierten synthetischen Peptiden sowie Standardproteinen evaluiert wurden. Nach diesen Vorexperimenten sollte das endogene Vorkommen von pHis in Prokaryoten untersucht werden, da pHis als intermediäre PTM u.a. im PEP-PTS System bereits nachgewiesen werden konnte [123]. Als Modellsystem wurde *E. coli* gewählt, da sie leicht kultivierbar sind, sich schnell vermehren und ihren Stoffwechsel somit schnell auf Änderungen im Kultivierungsmedium anpassen können. Zudem besitzen die bakteriellen Zellen einen geringeren dynamischen Bereich als z. B. humane Zellen.

4.4.1. Antikörper-basierter Nachweis von pHis

Eine Kooperation mit Prof. C. Hedberg (ehemals Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, jetzt Universität Umeå, Schweden) ermöglichte die Evaluierung der Spezifität eines anti-pHis spezifischen, polyklonalen Antikörpers, der nicht kommerziell erhältlich ist. Dieser Antikörper wurde für eine Immunodetektion sowie eine Immunpräzipitation (IP) herangezogen. Mittels *in vitro* phosphorylierter Proteine, die durch eine Inkubation mit Kaliumphosphoramidat selektiv an Histidin modifiziert wurden (siehe Kapitel 3.2.3.7), wurde die Spezifität des Antikörpers für pHis überprüft. Dies ist in Abbildung 4-19 exemplarisch am Beispiel von pHis-BSA gezeigt.

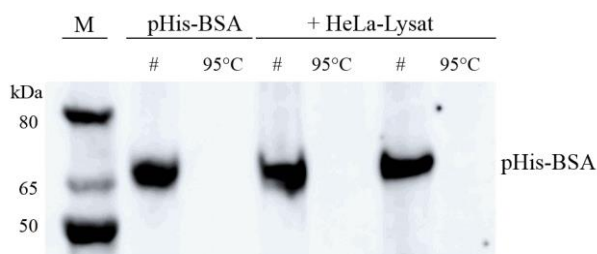


Abbildung 4-19: Kontrolle der Spezifität des anti-pHis Antikörpers mittels pHis-BSA. pHis-BSA (2,5 µg) wurde ohne Vorbehandlung („#“) sowie nach 15 minütiger Inkubation bei 95 °C, zur Entfernung der Phosphorylierung, detektiert. Zudem wurde die Reaktivität des Antikörpers gegenüber einem HeLa-Lysat (20 µg) mit Zusatz von pHis-BSA getestet (Duplikate in Spur 4-7). M = PageRuler Proteinmarker 10-250 kDa.

Zur Unterscheidung von echt und falsch positiven Signalen wurde zunächst eine Hälfte der Probe unbehandelt verwendet und die andere Hälfte, wie in der Literatur beschrieben [148], mit Säure behandelt. Erste Tests zeigten, dass das Aufkochen eines *E. coli* Zelllysats mit 1 % TFA für 60 min zu einer Präzipitation führte, sodass auf dem Gel der SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung keine getrennten Banden mehr erkennbar waren. Daher wurde als Negativkontrolle für die SDS-PAGE die Probe vor dem Beladen des Gels für 15 min bei 95 °C im LDS-Ladepuffer aufgeköcht. Hierdurch konnte sowohl die Phosphorylierung an Histidin effizient entfernt als auch die Trennschärfe der Proteinbanden im Vergleich zur unbehandelten Probe erhalten werden. Weder gegenüber der Negativkontrolle noch gegenüber einem komplexen Zelllysats, in dem O-Phosphorylierungen enthalten waren, konnten Nebenreaktionen beobachtet werden.

Nach diesen Vorversuchen sollte ein Nachweis von endogenen pHis in *E. coli* erfolgen. Die Kultivierung der Bakterien fand in Minimalmedium M63, dem Glukose oder Glycerol als Kohlenstoffquelle zugesetzt wurde, statt. Unter Zusatz von Glycerol statt Glukose als C-Quelle wurde das Wachstum der Bakterien deutlich verlangsamt, sodass eine Umstellung des Stoffwechsels und somit ein verändertes Phosphorylierungsmuster erwartet wurde. Zudem wurde die Kultivierung parallel mit einer Limitierung an verfügbarem Stickstoff im Minimalmedium, somit ohne Zusatz von Ammoniumsulfat, durchgeführt. Hierdurch wurde eine Steigerung der Histidinphosphorylierung, unabhängig von der Kohlenstoffquelle erwartet [123].

Nach Aufschluss der Bakterien mittels Ultraschalllanze sowie der Entfernung unlöslicher Zellbestandteile mittels Zentrifugation wurden pro Spur 30 µg *E. coli* Lysat unbehandelt bzw. nach Aufkochen bei 95 °C für 15 min auf das Gel für den Western Blot aufgetragen. Als Positivkontrolle diente phosphoryliertes Myoglobin (siehe Abbildung 4-20).

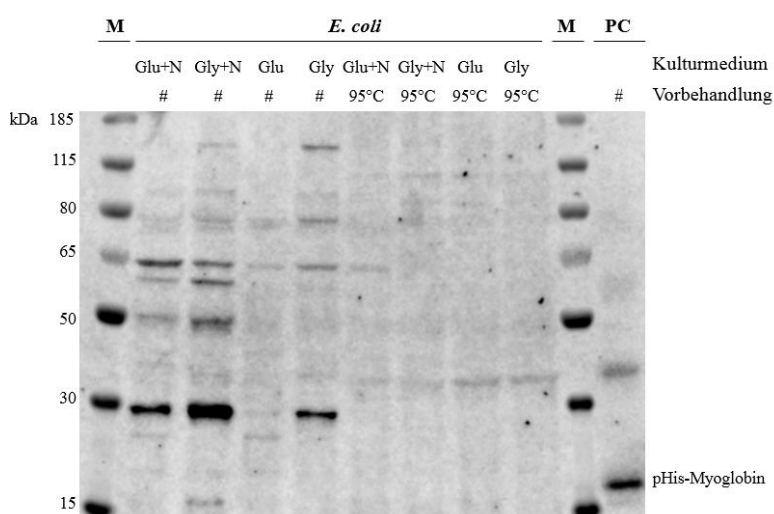


Abbildung 4-20: Nachweis endogener Histidinphosphorylierung in *E. coli* mittels anti-pHis Antikörper. Die Bakterien wurden unter verschiedenen Bedingungen herangezogen: „Glu“ = Glukose bzw. „Gly“ = Glycerol als C-Quelle. „+N“ = mit Stickstoffzugabe zum Minimalmedium. In den Negativkontrollen erfolgte die Auftragung in gleicher Reihenfolge nach Hitzebehandlung („95 °C“). M = PageRuler Proteinmarker 10-250 kDa; PC = pHis-Myoglobin.

Mittels Immunodetektion konnte eine endogene Phosphorylierung von Histidin in *E. coli* nachgewiesen werden. Sowohl bei der Kultivierung mit Glukose als auch mit Glycerol als C-Quelle waren deutlich stärkere Banden in der Positivkontrolle im Vergleich zur Negativkontrolle sichtbar. Zudem deuteten sich leichte Unterschiede im Phosphorylierungsmuster zwischen den beiden Kohlenstoffquellen an, insbesondere im Hinblick auf die Intensität von Signalen mit vergleichbarem Molekulargewicht. Auch in den Negativkontrollen waren schwache Banden zu sehen, die einer ungenügenden Blockierung der Membran mit BSA oder einer geringen Kreuzspezifität des Antikörpers zeugen könnten. Die in der Literatur beschriebene Zunahme der Phosphorylierung nach Limitierung des verfügbaren Stickstoffs im Medium konnte in keinem der durchgeführten Versuche bestätigt werden. Auch aufgrund des langsamen Wachstums der Bakterien (mehr als 14 h bis OD 1) wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Die erstellten *E. coli* Kulturen mit Glukosezusatz wurden im Laufe der Arbeit zur Etablierung von Anreicherungstechniken herangezogen, in denen jeweils mittels Western Blot das Vorliegen von Histidinphosphorylierungen initial überprüft wurde.

Trotz der hohen Spezifität des anti-pHis Antikörpers in Dot Blots und den gezeigten Western Blots konnte keine signifikante Anreicherung von pHis in Lösung erreicht werden. Hierbei wurden unterschiedliche Protokolle getestet, die sich u.a. an einem Protokoll von Kee *et al.* [123] orientierten, in dem ein in der Arbeitsgruppe generierter anti-pHis Antikörper gebunden an magnetische Beads erfolgreich zur IP von pHis aus *E. coli*-Lysaten eingesetzt werden konnte. Hierbei diente ein 25 mM Tris-Puffer mit 137 mM NaCl und 2,7 mM KCl als IP-Puffer sowie modifiziert mit 0,1 % Tween als Waschpuffer, während die Elution mit pTze pHis-Analagon oder LDS-Ladepuffer erfolgte. Die Ergebnisse konnten mit dem vorhandenen anti-pHis Antikörper weder an *in vitro* phosphorylierten Standardproteinen noch an *E. coli* Lysaten reproduziert werden. Auch die Verwendung verschiedener magnetischer Beads zur Kopplung des Antikörpers, Magnetbeads mit Protein A/G sowie NHS-aktivierte magnetische Beads (beide Thermo Fisher Scientific) und eine Verlängerung der Inkubationszeiträume der Antikörper-Bead-Komplexe mit den anzureichernden Proben, von 1 h auf 4 h sowie über Nacht, führten zu keiner Verbesserung der Anreicherung.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde daher darauf hingearbeitet eine Chromatographie-basierte Anreicherungsmethode für pHis mit anschließendem Nachweis mittels LC-MS/MS zu etablieren, um eine höhere Sensitivität des Verfahrens sowie den Einsatz niedrigerer Probenmengen als bei Antikörper-basierten Verfahren zu ermöglichen.

4.4.2. Optimierung des LC-MS basierten pHis-Nachweises

4.4.2.1. Untersuchungen zur Stabilität der Histidinphosphorylierung

Zur Untersuchung der Stabilität des Phosphohistidins in sauren Lösungen wurden zunächst Peptidstandards hergestellt. Da es bei N-Phosphorylierungen nicht möglich ist, die phosphorylierte

Aminosäure für die Peptidsynthese als „*building block*“ zu kaufen, erfolgte die Phosphorylierung der Peptide mittels Kaliumphosphoramidat nach der eigentlichen Synthese der Sequenzen (siehe Kapitel 3.2.3.7). Die Effizienz der Phosphorylierungsreaktion war stark von der Peptidsequenz abhängig sowie vom Alter des Phosphoramidats und lag zwischen 40-50%. Nach mehrfachem Auftauen der Probe oder mehrwöchiger Lagerung bei -80 °C sank der Anteil der phosphorylierten Variante teilweise auf unter 10 %.

Um die Stabilität der phosphorylierten Peptide besser einschätzen zu können, wurden vier synthetische Peptide (Peptid ID 441, 434, 401, 397; siehe Tabelle 3-5), die zuvor *in vitro* phosphoryliert wurden, in 0,1 % TFA in Wasser (pH 1,8-2,0) bei RT sowie bei 60 °C inkubiert. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 15, 30, 60, 120 oder 720 min. Anschließend wurden die Proben über eine C18-Phase mittels des TFA/FA-Standardpuffersystems bei 60 °C für 60 min getrennt und in einem Orbitrap Elite Massenspektrometer detektiert. Für die Auswertung wurde der Zeitpunkt der Zugabe von 0,1 % TFA zu den phosphorylierten Peptiden (0 min Inkubation) als 100 % gesetzt und die Fläche des jeweiligen phosphorylierten Peptids für die Zeitpunkte verglichen, um die Abnahme der Phosphorylierung zu zeigen (siehe Abbildung 4-21).

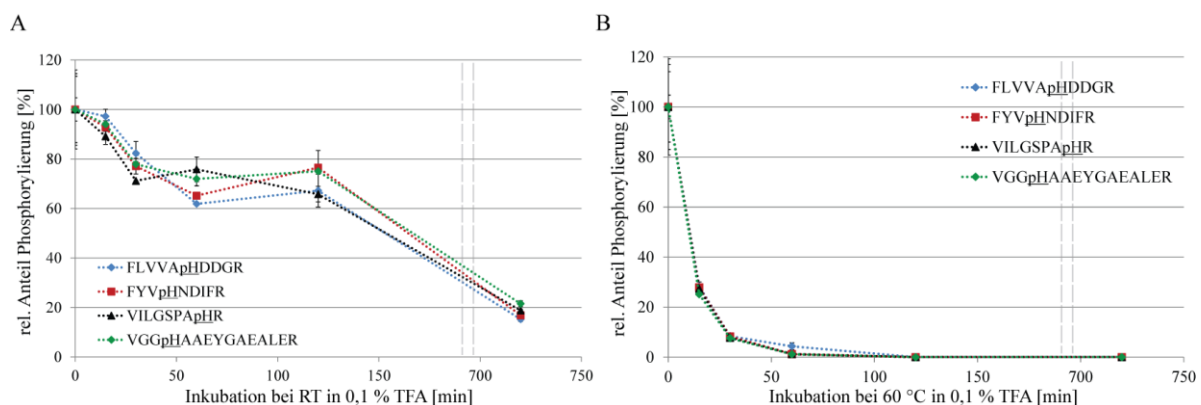


Abbildung 4-21: Überprüfung der Stabilität von pHis in 0,1 % TFA. Die Inkubation der vier phosphorylierten Peptide fand bei (A) RT oder (B) 60 °C für bis zu 720 min in 0,1 % TFA in H₂O statt (pH 1,8-2,0, Duplikate). Gezeigt ist die Abnahme der Fläche des phosphorylierten Peptids. Die Bestimmung der Flächen aus zwei technischen Replikaten erfolgte mittels der Software Skyline. Zur besseren Übersicht ist die Zeitachse gestaucht dargestellt.

Obwohl die Phosphorylierung an Histidin säurelabil ist, lagen nach einer zweistündigen Inkubation bei pH ~2 unter RT weniger als 40 % der Peptide dephosphoryliert vor. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass bei einer Erhöhung der Temperatur auf 60 °C die Dephosphorylierung der synthetischen Peptide deutlich schneller einsetzte. Bereits nach 15 min war die Fläche der phosphorylierten Peptide mehr als 70 % verringert, unabhängig von der Peptidsequenz. Nach einer 60 minütigen Inkubation der Probe bei 60 °C konnte keine Phosphorylierung mehr nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse zeigten, dass eine kurze Lagerung der Proben unter sauren Bedingungen, z. B. vor der LC-MS Analyse, möglich ist und auch kurze Waschschrte mit säurehaltigen Puffern in der Probenaufarbeitung eingebunden werden können. Kritisch war hingegen die Temperatur während der Inkubationszeit. Insbesondere im nano-HPLC-Bereich werden oft hohe Temperaturen eingesetzt, um den Druck des Systems zu senken, sodass die Analyten während der gesamten Trennung hohen Temperaturen ausgesetzt sind. In der verwendeten Analysemethode wurde die Temperatur im Säulenofen von 60 °C auf 35 °C verringert, was bei einer Flussrate von 250 nL/min keine Druckprobleme verursachte. Zudem wurde eine angepasste Festphasenextraktion für pHis-Proben angewendet, bei der eine Neutralisation der Eluate mit 25 %iger NH₄OH-Lösung vor der Vakuumtrocknung erfolgte, da dieser Schritt in Abhängigkeit vom Volumen der Probe mehrere Stunden dauern kann.

4.4.2.2. Optimierung der chromatographischen Bedingungen

Ausgehend von Literaturrecherchen wurden unterschiedliche HPLC-Puffersysteme für die Analyse von pHis mittels C18 getestet [22, 121, 149].

Zu Beginn der Arbeit wurde zunächst ein Puffersystem mit 10 mM Ammoniumhydroxid, eingestellt auf pH 8, als wässrige Komponente der mobilen Phase eingesetzt. Unter diesen Pufferbedingungen konnte jedoch kein stabiles Spray mit der nano-Kopplung zwischen LC und MS aufgebaut werden. Dieses lag zum einen an einer unvollständigen Ionisierung, die aufgrund der fehlenden Protonierung der Analyten in der mobilen Phase im positiven MS-Modus auftrat und zum anderen daran, dass der Zerstäuber bereits nach wenigen Messungen durch Salzkristalle blockiert war. Um eine effizientere Ionisierung und ein reproduzierbares Messsystem gewährleisten zu können, wurde ein Puffersystem mit 10 mM Ammoniumacetat (NH₄Ac), eingestellt auf pH 6, getestet. Ein Vergleich der Puffersysteme anhand der Messungen eines Standard-HeLa-Verdaus (0,25 µg, LC-MS 120 min) zeigte, dass die Identifikationsrate an Proteinen durch Verwendung von NH₄Ac um 15 % und die Anzahl identifizierter Peptide sogar um 31 % im Vergleich zu Messungen mit Ammoniumhydroxid verbessert werden konnte. Nach diesen allgemeinen Vorversuchen wurde der Einfluss der mobilen Phase auf die Phosphorylierung an Histidin anhand von chemisch phosphoryliertem BSA nach Trypsinverdau in vier verschiedenen HPLC-Lösungsmittelsystemen evaluiert, die in Tabelle 3-17 und Tabelle 3-18 beschrieben sind. Die Beurteilung der HPLC-Puffer erfolgte anhand der Peakflächen (XICs) und der chromatographischen Auftrennung phosphorylierter Peptide von pHis-BSA (siehe Abbildung 4-22).

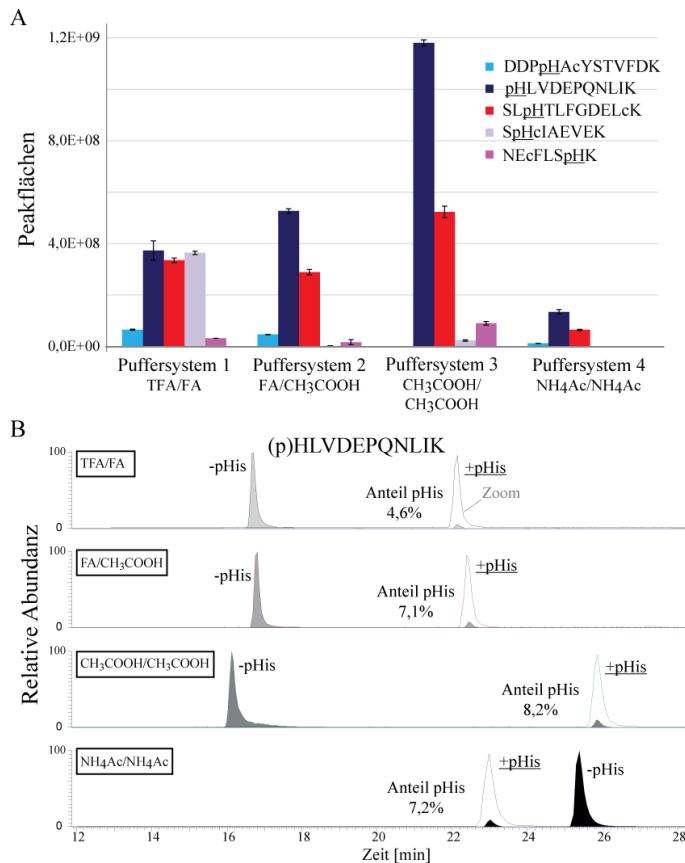


Abbildung 4-22: Vergleich verschiedener mobiler Phasen für die Analyse von pHis mittels LC-MS. (A) Exemplarisch wurden fünf phosphorylierte Peptide von pHis-BSA ausgewählt und die absoluten Peakflächen verglichen. Die Bestimmung der Flächen erfolgte mittels der Software Skyline. (B) Zudem erfolgte ein direkter Vergleich der Auftrennung des phosphorylierten Peptids (p)HLVDEPQNLK sowie die Bestimmung des Anteils des pHis Peptids an der Probe anhand von XICs in Xcalibur (je 200 fmol pHis-BSA Verdau).

Für die fünf gewählten tryptischen Phosphopeptidsequenzen aus pHis-BSA konnten deutliche Unterschiede der Phosphorylierungslevel zwischen den Puffern und in Abhängigkeit von der Peptidsequenz festgestellt werden. Bei drei von fünf Sequenzen konnte mittels 0,1 % Essigsäure-Puffersystem bei pH ~3,2 (System 3) die größte Menge an phosphoryliertem Peptid nachgewiesen werden. Auch das Aufspülen auf die Vorsäule mit 0,1 % FA und eine Trennung mit 0,1 % Essigsäure führte zu hohen absoluten Peakflächen (System 2). In diesen beiden Puffersystemen konnte jedoch das Peptid SpHcIAEVEK nur schwach detektiert werden. Es zeigte sich, dass das saure Standardsystem mit pH \leq 2,8 (Puffersystem 1) trotz eines teilweisen Verlusts der Phosphorylierung, was auch am geringsten Anteil des phosphorylierten Peptids an der Gesamtmenge des Peptids sichtbar wurde (siehe Abbildung 4-22 B), absolut gesehen bei allen pHis-Peptiden zu einem sensitiven Nachweis führte, der weniger von der Peptidsequenz beeinflusst wurde. Die geringste Sensitivität lag in dem 10 mM Ammoniumacetat-Puffersystem bei pH 6 (System 4) vor. Ein Vergleich der chromatographischen Auftrennung, exemplarisch gezeigt für das Peptid pHLVDEPQNLK und seine dephosphorylierte Variante, ließ erkennen, dass die Peptide bei der Verwendung von Essigsäure (Puffersystem 3) und Ammoniumacetat

(Puffersystem 4) teilweise ein ausgeprägtes Tailing zeigten oder verbreitert von der Säule eluierten. Interessant war hierbei, dass sich die Elutionsreihenfolge von phosphoryliertem und dephosphoryliertem Peptid bei pH 6 im Gegensatz zu den saureren Puffersystemen veränderte, sodass bei pH 6 zuerst das pHis-Peptid eluierte. Das Standardpuffersystem (System 1) führte zu den geringsten Peakbreiten sowohl für die phosphorylierte als auch für die dephosphorylierte Form der Peptide. Der hohe Anteil an nicht phosphorylierten Peptiden ist durch eine unvollständige Reaktion der Histidine mit Kaliumphosphoramidat oder die Lagerung des pHis-BSA Verdaus bei -80 °C über mehrere Wochen zu erklären. Allerdings lag in allen Puffersystemen das gleiche Verhältnis von Histidin und Phosphohistidin zu Beginn der Messungen vor.

Insbesondere im Hinblick auf den Nachweis von endogenen Phosphorylierungen war eine hohe Sensitivität wichtig, was bei einem neutralen Puffersystem aufgrund der eingeschränkten Ionisierung der Analyten in der mobilen Phase und des teilweise starken Tailings der Peptide nicht gegeben war. Im weiteren Verlauf der Arbeit erfolgte die Auftrennung komplexer Proben daher mittels 0,1 % TFA/FA Puffersystem (Standardsystem 1), da in diesem System eine relativ sensitive Detektion unabhängig von der Peptidsequenz möglich war. Vor allem im Hinblick auf die Phosphorylierungsrate einzelner Peptide wurde alternativ auch das Puffersystem mit 0,1 % Essigsäure eingesetzt (System 3).

4.4.2.3. Besonderheiten der pHis-Detektion mittels LC-MS

Der Nachweis von Phosphorylierungen hängt nicht nur von einer optimalen Probenvorbereitung ab, sondern auch von den Parametern der Datenbanksuche, wie den verwendeten Suchalgorithmen und den Kriterien zur Lokalisierung der PTMs. Bei der Zuweisung der Phosphorylierung zu einer Aminosäure eines Proteins wurde zunächst, wie auch für den Nachweis der O-Phosphorylierung, der phosphoRS Algorithmus eingesetzt (phosphoRS Wert ≥ 90 %). Zusätzlich erfolgte die Inkubation eines Teils der Probe mit 1 % TFA für 60 min bei 60 °C, um sicher zu gehen, dass es sich bei der detektierten Phosphorylierung um eine säurelabile Phosphorylierung am Histidin handelte (Negativkontrolle).

Als Testprobe diente wiederum verdautes pHis-BSA, welches sowohl nach HCD-, als auch nach CID-Fragmentierung in der Orbitrap Elite gemessen wurde (60 min Gradient, TFA/FA-Puffersystem). Hierbei konnten acht phosphorylierte Peptidsequenzen mittels HCD- bzw. neun mittels CID-Fragmentierung und Mascot-Suchalgorithmus identifiziert werden. Als Filterkriterien wurden eine FDR ≤ 5 % und ein *Mascot Peptide Ion Score* ≥ 15 gewählt, da durch die mehreren tausend Einträge (>6900 Einträge) der verwendeten hausinternen Datenbank die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten falsch positiver BSA-Identifikationen relativ gering war. In der Negativkontrolle, die mit 1 % TFA bei 60 °C für 60 min behandelt worden war, konnte kein phosphoryliertes Peptid detektiert werden, sodass falsch positive Treffer ausgeschlossen werden konnten.

Eine Weiterentwicklung von phosphoRS stellt der Algorithmus ptmRS (<http://ms.imp.ac.at/?goto=ptmrs>) dar, der ebenfalls eine Wahrscheinlichkeit für die Lokalisierung einer

Phosphorylierung bestimmt. Dieser Algorithmus beinhaltet zudem die Möglichkeit verschiedene PTMs auszuwählen und Neutralverluste sowie diagnostische Ionen pro PTM selbst zu spezifizieren, die von phosphoRS nicht berücksichtigt werden. Wenn keine Anpassung der Suchparameter (im eingebundenen XML File in Proteome Discoverer) vorgenommen wird, entsprechen die Standardeinstellungen für die PTM „Phosphorylierung“ denen von phosphoRS. Unter diesen Standardeinstellungen konnten von 24 identifizierten Phospho-PSM nach HCD-Fragmentierung allerdings nur sechs Phosphorylierungen korrekt (ptmRS-Wert ≥ 90 %) Histidin zugeordnet werden, nach CID-Fragmentierung waren es neun von 22 Phospho-PSM. Alle anderen Phosphorylierungen wurden Serin, Threonin sowie Tyrosin zugeordnet oder die Lokalisierung war nicht eindeutig möglich.

Um die Zuordnung der Histidinphosphorylierung zu verbessern, wurden daraufhin einzelne Spektren von pHis-Peptiden auf zusätzliche und unbekannte auftretende Neutralverluste sowie diagnostische Ionen untersucht (siehe Abbildung 4-23). Während bei CID-Fragmentierung die Abspaltung von Phosphorsäure H_3PO_4 (-98 Da) vom Vorläuferion das Spektrum dominierte, traten bei HCD-Fragmentierung sowohl Neutralverluste von Phosphorsäure als auch von Metaphosphorsäure HPO_3 (-80 Da) vom Vorläuferion auf. HCD-Spektren wiesen insgesamt einen höheren Informationsgehalt auf.

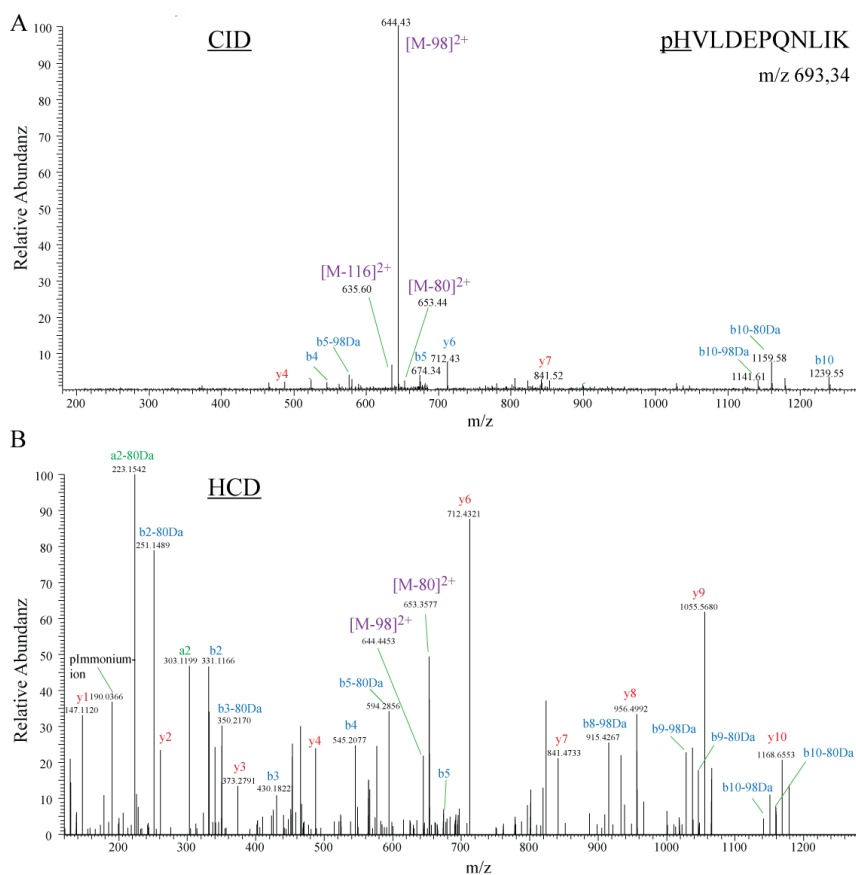


Abbildung 4-23: Analyse der MS/MS Fragmente eines pHis-Peptids nach CID- und HCD-Fragmentierung. (A) In Fragmentionenspektren von pHVLDEPQNLIK (m/z 693,34; 2+) nach CID-Fragmentierung dominierte der Neutralverlust (NL) von Phosphorsäure (- H_3PO_4 , 98 Da). (B) Nach HCD-Fragmentierung trat neben einem Verlust von Phosphorsäure ein Verlust von Metaphosphorsäure vom zweifach geladenen Vorläuferion auf (- HPO_3 , 80 Da). Auffallend waren die intensiven a2-80 Da und b2-80 Da Ionen.

Wie in der Abbildung gezeigt, waren die Ionen der b- und y-Serie meist vollständig detektierbar. Wohingegen bei CID-Spektren von pHis, ähnlich wie bei pSer/pThr, die Ionenserien durch das intensive Signal des Vorläuferions mit dem Verlust von Phosphorsäure $[M-98]^{+2}$ niedrige Signale aufwiesen und teilweise vom Rauschen überlagert wurden. Bei CID-Spektren konnte ein Verlust von Wasser zusätzlich zum Verlust der Phosphorsäure beobachtet werden (-116 Da). Als pHis-Fragmentationen traten sowohl mit b-98 Da als auch b-80 Da Ionen auf. Diese Beobachtungen decken sich mit dem Fragmentierungsverhalten von pArg-Peptiden [150]. Zudem konnte bei der HCD-Fragmentierung bei einigen Spektren das Phosphohistidin-Immoniumion als Markerion herangezogen werden, welches bei 190,04 Da auftrat.

Anhand dieser Erkenntnisse wurden die Einstellungen von ptmRS für die Phosphorylierung an Histidin in dem ptmRS XML-Skript angepasst (siehe Anhang Tabelle 12-6). Mit Hilfe des angepassten Skripts konnten nach HCD-Fragmentierung 23 der 24 detektierten Phospho-PSM als Histidinphosphorylierung mit einem ptmRS-Wert von ≥ 90 % lokalisiert werden (siehe Tabelle 4-2). Somit konnten von 17 möglichen phosphorylierten Histidinen in BSA elf als phosphoryliert in dieser direkten Messung nachgewiesen werden.

Tabelle 4-2: Vergleich der Lokalisierung der Phosphorylierung mit unterschiedlichen Einstellungen von ptmRS nach HCD-Fragmentierung. Dargestellt sind die Ergebnisse der Datenbanksuche mittels Mascot und ptmRS von 1 pmol pHis-BSA Verdau. Zuweisungen zu pSer/pThr/pTyr sowie unsichere Lokalisierungen sind fett markiert.

Sequenz	Standardeinstellungen		XML für pHis		Mascot Ion Score
	DI*	ptmRS-Wert	DI*	ptmRS-Wert	
DDPHAcYSTVFDK		H4(Phosp): 49.91; Y7(Phosp): 49.91		H4(Phos): 100	49
DTHKSEIAHRFK		T2(Phosp): 49.89; H3(Phosp): 49.89		H9(Phos): 100	18
HLVDEPQNLIK		H1(Phosp): 100	190,04	H1(Phos): 100	64
LcVLHEK		H5(Phosp): 100		H5(Phos): 100	28
LFTFHADiCTLPDTEK		T10(Phosp): 100		H5(Phos): 100	27
LFTFHADiCTLPDTEK		T10(Phosp): 99.71		H5(Phos): 100	55
LKHLVDEPQNLIK		H3(Phosp): 100		H3(Phos): 100	15
LKHLVDEPQNLIK		H3(Phosp): 100		H3(Phos): 100	38
LKHLVDEPQNLIK		H3(Phosp): 100		H3(Phos): 100	47
NEcFLSHK		S6(Phosp): 99.54		H7(Phos): 100	29
NEcFLSHKDDSPDLPK		S6(Phosp): 99.6		H7(Phos): 100	37
NEcFLSHKDDSPDLPK		S6(Phosp): 33.33; H7(Phosp): 33.33; S11(Phosp): 33.33		H7(Phos): 49.82; S11(Phos): 49.82	34
QEPERNEcFLSHKDDSPDLPK		S11(Phosp): 50; H12(Phosp): 50		H12(Phos): 99.99	16
RHPEYAVSVLLR		Y5(Phosp): 99.75		H2(Phos): 100	63
RHPEYAVSVLLR		H2(Phosp): 98.54		H2(Phos): 100	42
SEIAHRFK		S1(Phosp): 100		H5(Phos): 100	34
SEIAHRFK		S1(Phosp): 100		H5(Phos): 100	17
SEIAHRFK		S1(Phosp): 100		H5(Phos): 100	32

SHcIAEVEK	S1(Phosp): 99.67	H2(Phos): 100	42
SLHTLFGDELcK	S1(Phosp): 99.64	H3(Phos): 99.55	52
SLHTLFGDELcK	S1(Phosp): 99.36	H3(Phos): 100	49
SLHTLFGDELcK	S1(Phosp): 33.33; H3(Phosp): 33.33; T4(Phosp): 33.33	H3(Phos): 100	55
SLHTLFGDELcK	S1(Phosp): 100	190,04 H3(Phos): 100	68
TcVADESHAGcEK	T1(Phosp): 100	H8(Phos): 100	68

*DI = diagnostisches Ion

Durch den starken Neutralverlust von Phosphorsäure bei der CID-Fragmentierung und die daraus resultierenden geringen Intensitäten der Fragmentionen, konnte auch mit Hilfe des angepassten ptmRS-Skripts keine Verbesserung der Lokalisierung der Histidinphosphorylierung erfolgen.

Aus diesem Grund wurde die HCD-Fragmentierung (Orbitrap Elite oder QExactive) für alle weiteren LC-MS Messungen in Kombination mit dem angepassten ptmRS-Skript für die Datenauswertung eingesetzt. Zusätzlich wurde eine manuelle Validierung der Spektren von phosphorylierten Peptiden durchgeführt, um sowohl falsch positive als auch falsch negative Treffer zu vermeiden.

4.4.3. Indirekter Phosphohistidinnachweis mittels SCX

Starke Kationenaustauscher wurden in diesem Projekt zunächst eingesetzt, um einen möglichst hohen Anteil an pHis-Peptiden in den generierten Peptidstandards nach *in vitro* Phosphorylierung der synthetischen Peptide zu erhalten. Hierbei wurde ausgenutzt, dass die phosphorylierten Peptide in den SCX-Puffern bei pH 2,7 aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppe eine um 1+ verringerte Nettoladung aufwiesen als ihre nicht modifizierte Variante. Anhand von Standardpeptiden konnte gezeigt werden, dass diese beiden Ladungszustände ausreichend voneinander getrennt waren, um reine Peptidfraktionen zu sammeln. Diese Tatsache sowie die Säurestabilität der P-N Bindung von pHis wurden im Folgenden ausgenutzt und optimiert, um pHis-Peptide aus komplexen Proben anzureichern.

4.4.3.1. Etablierung der Methodik an Peptid- und Proteinstandards

Basierend auf dem genannten Prinzip der Ladungstrennung mittels SCX, führte die Inkubation von pHis-Peptiden in 1 % TFA für 60 min bei 60 °C zu einer Desphosphorylierung und somit bei einer erneuten Auftrennung der Probe zu einer signifikanten Änderung der Retentionszeit im Vergleich zum phosphorylierten Peptid. Das initiale Fraktionierungsschema wurde ausgehend von einem hausintern etablierten Verfahren zur Trennung von definierten Ladungszuständen mittels SCX eingesetzt [113] und an den verwendeten Gradienten angepasst. Die Fraktionierung und der induzierte Shift des Peptids nach Säurebehandlung sind in Abbildung 4-24 exemplarisch am Beispiel des phosphorylierten Peptids VILGSPApHR (Peptid ID 434, ~300 pmol) gezeigt.

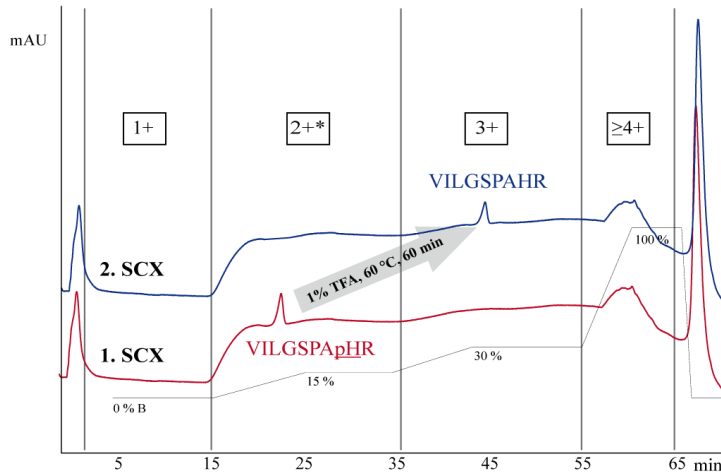


Abbildung 4-24: Induzierter Shift eines pHis-Peptids nach Säurebehandlung. Bei einer erneuten SCX-Auftrennung der behandelten Probe war eine Veränderung der Retentionszeit sichtbar, exemplarisch gezeigt an VILGSPAHR. Die phosphorylierte Variante eluierte in Fraktion 2+*, die dephosphorylierte nach Säureinkubation (1 % TFA, 60 °C, 60 min) in Fraktion 3+. Die Fraktionierung erfolgte zeitabhängig (graue Linien) in vier erwartete Ladungszustände.

Wichtig für die Stabilisierung von pHis war, dass etwa 10 % des Volumens der späteren Fraktion an 200 mM TEAB in das Auffanggefäß vorgelegt wurde, um möglichst schnell einen $\text{pH} \geq 5$ einzustellen. Zur Überprüfung der Ladungszustände wurden je 4 μL einer Fraktion (in 11 μL H_2O) mittels LC-MS, unter Verwendung des Essigsäure-Puffersystems, analysiert. Die theoretischen Ladungszustände der identifizierten PSM wurden in Excel, ausgehend von dem erwarteten Ladungszustand der vorliegenden Aminosäuren und PTMs bei $\text{pH} 2,7$, berechnet. Bei einer Fraktionierung von 30 μg verdautem pHis-BSA konnten sowohl in Fraktion 3+ als auch in 4+, somit über eine Gesamttrenndauer von ~ 65 min, noch pHis-Peptide identifiziert werden, wie R_pHPEYAVSVLLR in Fraktion 3+ und VhKEccHGDLLEcADDR in Fraktion 4+, was von der relativ hohen Stabilität von pHis bei $\text{pH} 2,7$ zeugt.

Bei der Auftrennung des pHis-BSA fiel eine unvollständige Ladungstrennung nach dem bisherigen Fraktionierungsschema auf: Die Reinheit der Fraktion 2+*, d. h. der Anteil von zweifach geladenen Peptiden, betrug etwa 95 % (~ 4 % 3+, < 1 % 1+), die Reinheit von Fraktion 3+ für dreifach geladene Peptide etwa 97% (~ 2 % 4+, 1 % 2+). Weitere Auftrennungen von *in vitro* phosphorylierten Peptiden, die nicht aufgereinigt worden waren, bestätigten die Überlappung von zweifach und dreifach geladenen Peptiden in der bisherigen Fraktion 2+*, sodass das Fraktionierungsschema angepasst wurde (siehe Abbildung 4-25 A).

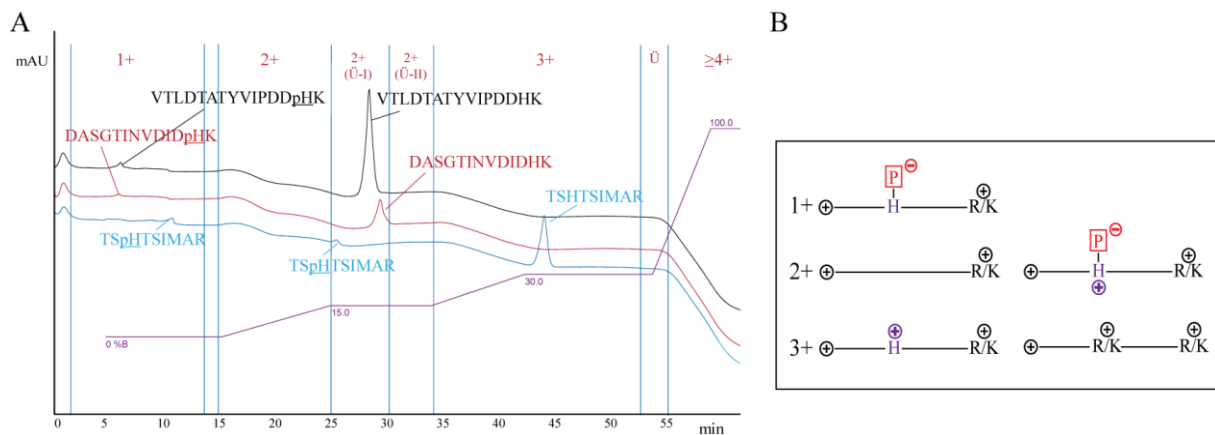


Abbildung 4-25: Angepasstes Fraktionierungsschema zur Trennung unterschiedlicher Ladungszustände. (A) Für eine optimale Trennung von zwei- und dreifach geladenen Peptiden wurde das initiale Fraktionierungsschema angepasst und Fraktion 2+* in drei Fraktionen getrennt. Exemplarisch sind die Chromatogramme für drei unaufgereinigte, *in vitro* phosphorylierte Peptide dargestellt. (B) Histidin kann in seinem phosphorylierten Zustand, bezogen auf die Nettoladung von pHis bei pH 2,7, sowohl negativ geladen als auch ungeladen vorliegen.

Nicht phosphorylierte, Histidin-haltige Peptide eluierten deutlich früher als erwartet in Fraktion 2+*, sodass sie teilweise auch mit pHis-Peptiden überlappten. Um eine bessere Trennung von zwei- und dreifach geladenen Peptiden zu erreichen, wurde Fraktion 2+* in drei Fraktionen, 2+, 2+(Ü-I) und 2+(Ü-II), unterteilt. In den Übergangsfractionen konnte keine eindeutige Trennung benachbarter Ladungszustände erfolgen, da die Unterschiede der Retentionszeiten zu gering waren. Es zeigte sich zudem, dass bei einigen pHis-Peptiden neben Signalen in 2+ und 2+(Ü-I), auch schwache Signale in Fraktion 1+ im SCX UV-Chromatogramm sichtbar waren. Diese Beobachtung kann mit den möglichen Ladungszuständen von tryptischen Peptiden bei pH 2,7 erklärt werden (siehe Abbildung 4-25 B, gezeigt bis Ladung 3+).

4.4.3.2. Indirekter Nachweis endogener pHis in *E. coli*

Im Hinblick auf die Analyse komplexer Proben war es wichtig, die in der Fraktion 2+ eluierenden pHis-Peptide anzureichern, die bei einmaliger SCX-Auftrennung durch die Elution eines Großteils der unmodifizierten tryptischen Peptide in dieser Fraktion überlagert wurden und nicht nachweisbar waren. Das optimierte Fraktionierungsschema wurde daher im Folgenden für eine zweistufige Anreicherungsstrategie herangezogen, bei dem der Säure induzierte Ladungsschift für einen indirekten Nachweis endogener Histidinphosphorylierung in *E. coli* ausgenutzt wurde.

Anhand der Ergebnisse der Immunodetektion mit dem pHis-Antikörper (siehe Kapitel 4.4.1) konnte bereits gezeigt werden, dass nach Kultivierung in Minimalmedium mit Glukose pHis-Proteine vorlagen. Zur Erhaltung dieses Phosphorylierungslevel wurde eine schonende und schnelle Aufarbeitung der Zellen innerhalb von 24 h vor der ersten SCX-Auftrennung durchgeführt. Nach einer Ethanol-fällung in Lösung erfolgte ein tryptischer Verdau der Proteine in Lösung, gefolgt von einer Entsalzung mittels

C18-Kartuschen. Hierbei wurden die Wasch- und Elutionsschritte mit 0,01 % FA statt TFA durchgeführt, um die Probe nach der Trocknung direkt in SCX-Puffer A aufnehmen und trennen zu können.

Da aufgrund der indirekten Nachweismethode falsch positive Identifikationen trotz Optimierung der Ladungstrennung nicht vollständig ausgeschlossen werden konnten, wurden insgesamt vier Proben mit jeweils 200 µg des *E. coli* Verdaus eingesetzt, wobei zwei Proben als Negativkontrolle dienten. Beispielhaft ist diese zweistufige Anreicherung in Abbildung 4-26 für die Fraktion 2+ dargestellt.

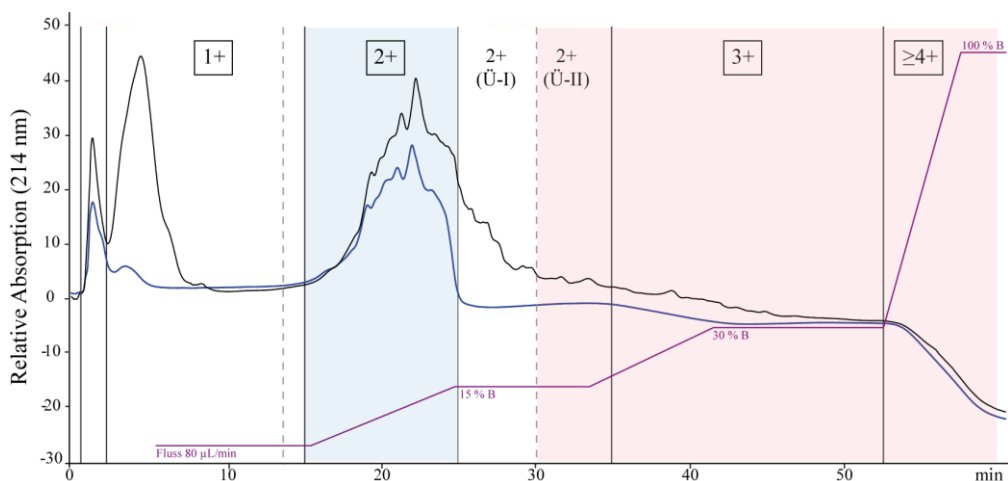


Abbildung 4-26: SCX-Chromatogramm des *E. coli* Verdaus nach ein- bzw. zweistufiger Auftrennung. Die Fraktionierung erfolgte nach erwarteten Ladungszuständen in den eingezeichneten Zeitintervallen (graue Linien). Für die zweite Auftrennung (blau) wurde die 2+ Fraktion der ersten Auftrennung (schwarz) eingesetzt. Zur Identifizierung der dephosphorylierten pHis-Peptide wurden die Fraktionen 2+(Ü-II), 3+ und ≥4+ berücksichtigt (rosa).

Für den endogenen Nachweis von pHis in *E. coli* wurden die Fraktionen 1+ und 2+ nach der ersten SCX-Trennung getrocknet und, nach Inkubation mit 1 % TFA für 60 min bei 60 °C und einem weiteren Entsalzungsschritt, erneut aufgetrennt. Für die Identifizierung potentieller pHis-Peptide wurden die Fraktionen 2+(Ü-II), 3+ und ≥4+ (inkl. der Übergangsfraction 3+Ü) mittels LC-MS analysiert. Es wurden nur Peptide bei der Auswertung berücksichtigt, von denen mindestens zwei Spektren identifiziert wurden und die in keiner der beiden Negativkontrollen nachweisbar waren. Selbst in dieser komplexen Probe betrug die Reinheit der Fraktion 2+ nach der ersten Auftrennung 99,6 %, +/- 0,3 % auf PSM-Ebene. Obwohl auch pHis-Peptide in Fraktion 2+(Ü-I) zu erwarten waren (siehe Abbildung 4-25), wurde aufgrund von möglichen falsch positiven Histidin-haltigen Peptiden diese Fraktion nicht bei der Datenauswertung berücksichtigt.

Insgesamt wurden mit dieser Strategie 49 Histidin-haltige Peptide identifiziert, die von Fraktion 1+ bzw. 2+ geshiftet waren und von denen 35 Peptide in beiden Replikaten gefunden wurden (siehe Tabelle 12-7). Diese Peptidsequenzen beinhalten sechs der bisher bekannten 63 Phosphorylierungsstellen an Histidin in *E. coli* (siehe Tabelle 4-3).

Tabelle 4-3: Indirekt identifizierte pHis- Peptidsequenzen aus *E. coli* nach zweistufiger SCX-Anreicherung. Aufgelistet sind die 7 Peptidsequenzen, die bekannte Proteinphosphorylierungen an Histidin enthalten (basierend auf www.uniprot.org).

Peptidsequenz	PSMs	Protein Accession	pStelle Protein	Proteinname
TSHTSIMAR	15	P08839	H189	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase (ptsI)
MGHAGAIAGGK	19	P0AGE9	H247	Succinyl-CoA ligase (sucD)
GGRTCHAAIAR	4	P23538	H421	Phosphoenolpyruvate synthase (PEP synthase, ppsA)
TCHAAIAR	5	P23538	H421	Phosphoenolpyruvate synthase (PEP synthase, ppsA)
DGAANSHAAIMVR	2	P37177	H356	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase (ptsP)
GICLSAGSPVSHSALIAR	2	P37349	H430	PTS-dependent dihydroxyacetone kinase, phosphotransferase subunit (dhaM)
MGSTGIGNGIAIPHGK	3	P69829	H43	Nitrogen regulatory protein (PTS system EIIA component, ptsN)

Diese Ergebnisse zeigen, dass trotz der geringen Startmenge von insgesamt 400 µg der indirekte Nachweis von pHis-Proteinen in komplexen Proben möglich ist. Im Vergleich zu bisherigen Studien zur Analyse von pHis in Prokaryoten, bei denen 15 pHis aus *E. coli* mittels IP und anschließender LC-MS Detektion aus 5 mg Zellysate direkt identifiziert werden konnten [30], wurde in diesem SCX-basierten Ansatz somit weniger als 10 % der Probenmenge benötigt. Interessant war, dass 25 der identifizierten 35 Peptidsequenzen ein Histidin als erste Aminosäure aufwiesen (siehe vollständige Liste Anhang Tabelle 12-7).

Eine Untersuchung der zugehörigen Proteine auf Protein-Protein-Interaktionen mittels der Software STRING zeigte, dass viele Interaktionen und angereicherte Signalwege wie Stoffwechsellwege im Allgemeinen (22 Proteine, p-Wert $1,1 \cdot 10^{-4}$) sowie im Kohlenstoff- (8 Proteine, p-Wert $1,1 \cdot 10^{-3}$) und Purin-Stoffwechsel (6 Proteine, p-Wert $7,5 \cdot 10^{-3}$) vorliegen. Die bereits bekannten pHis-Proteine ptsP, ptsN, ptsI, dhaM und ppsA weisen Pyruvat/PEP-ähnliche Domänen auf und stehen direkt oder indirekt mit dem PEP-PTS System in Verbindung [30]. Diese fünf genannten Proteine sowie mehrere bisher unbekannte mögliche pHis-Proteine, wie pykA (Pyruvatkinase II) und pts (Phosphat-Acetyltransferase), sind zudem in biologische Prozesse wie „Phosphorylierungsreaktionen“ (19 Proteine, p-Wert $1,8 \cdot 10^{-5}$) involviert.

4.4.4. Direkter Phosphohistidinnachweis mittels ERLIC

Für die Etablierung eines direkten pHis-Nachweises wurde die *Electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography* herangezogen, welche bereits erfolgreich für eine sensitive Anreicherung von O-Phosphorylierungen eingesetzt werden konnte [117, 119]. Die Kombination von AX und HILIC

ermöglicht eine effiziente Trennung von phosphorylierten und nicht modifizierten Peptiden. Hierbei eluieren die nicht phosphorylierten Peptide bereits zu Beginn, meist in den ersten fünf Minuten des Chromatogramms, während phosphorylierte Peptide stärker retardiert werden.

4.4.4.1. Etablierung der Methodik an Peptid- und Proteinstandards

Anhand der bisherigen Ergebnisse und der erfolgreichen Anwendung für die Anreicherung von O-Phosphorylierungen wurde das von Loroch *et al.* [119] publizierte ERLIC-Puffersystem aus 20 mM NaMePO₄ in 70 % ACN, pH 2 (Puffer A) und 200 mM TEAP in 60 % ACN, pH 2 (Puffer B) gewählt (für weitere Parameter siehe Kapitel 3.2.5.3). Zunächst wurden unterschiedliche pH-Werte für ERLIC-Puffer A evaluiert: pH 3,0, pH 3,5 und pH 5,0 im Vergleich zu pH 2. Durch die Erhöhung des pH-Wertes wurde die Effizienz der Trennung von phosphorylierten und nicht phosphorylierten Peptiden abgeschwächt, da neben den negativ geladenen Phosphatresten auch saure Aminosäuren in höherem Maße negativ geladen vorlagen und somit insbesondere Peptide mit mehreren sauren Aminosäuren zu einem späteren Zeitpunkt von der Säule eluieren [117]. Dieser Effekt musste bei der Anpassung des Puffersystems gegenüber dem Verlust der Phosphorylierung bei saureren pH-Werten abgewogen werden. Wie auch bei der Fraktionierung mittels SCX wurden die gesammelten Proben auf pH ≥ 5 eingestellt, um das Fortschreiten der Dephosphorylierung schnellst möglich zu stoppen.

Der Einfluss der unterschiedlichen pH-Werte des ERLIC-Puffers A wurde, wie erwartet, vor allem bei Peptiden mit sauren Aminosäuren deutlich, sodass eine Trennung der phosphorylierten und nicht phosphorylierten Variante von L(p)SLTDPLVAERAGTDESR bei pH 3,0 und 3,5, nicht aber bei pH 5, möglich war (siehe Abbildung 4-27 A). Im Gegensatz dazu konnten die beiden Varianten des Peptids SL(p)SVLSPR bei allen drei pH-Werten erfolgreich getrennt werden.

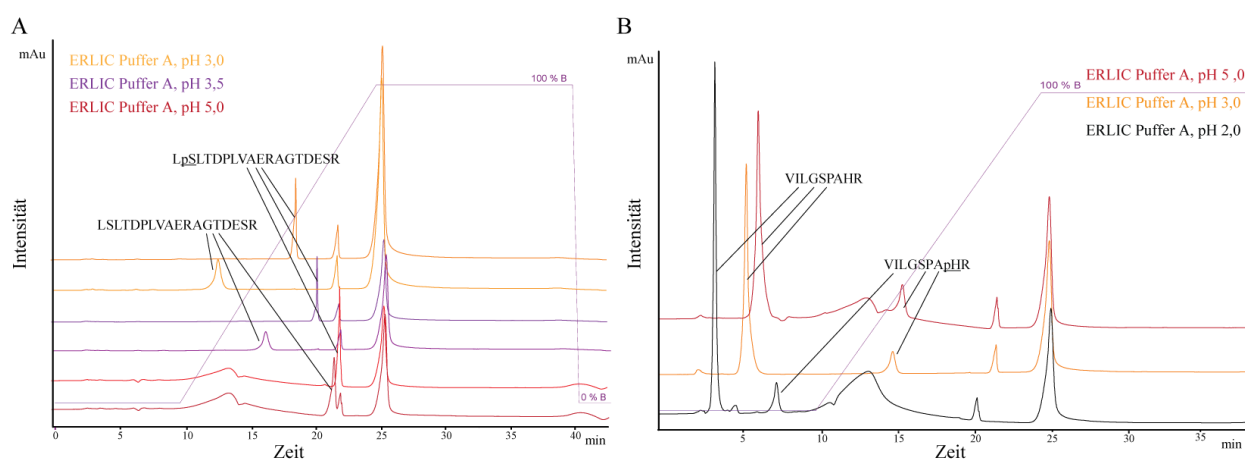


Abbildung 4-27: Anpassung des pH-Wertes des ERLIC-Puffers A. (A) ERLIC-Trennung eines pSer-Peptids mit sauren Aminosäuren L(p)SLTDPLVAERAGTDESR und seiner nicht phosphorylierten Variante in Abhängigkeit vom pH-Wert (je 3 µg). (B) ERLIC-Trennung des pHis-Peptids VILGSPA(p)HR bei pH 2,0; 3,0 und 5,0.

Die wiederkehrenden Signale bei etwa 22 min und 26 min sind typisch für das verwendete ERLIC-Puffersystem und konnten auch im Blank detektiert werden.

Auch das pHis Peptid VILGSPA(p)HR (siehe Abbildung 4-27 B) konnte mittels ERLIC von seiner dephosphorylierten Form getrennt werden. Deutlich zu sehen war das höhere Signal der dephosphorylierten Variante im Chromatogramm bei Verwendung des ERLIC-Puffers A mit pH 2,0. Eine anschließende direkte LC-MS Messung von je 1 % des Volumens der Fraktionen, die basierend auf den Signalen im UV-Chromatogramm gesammelt wurden, bestätigte das Vorliegen eines hohen Anteils des pHis-Peptids VILGSPA_pHR (m/z 515,267) in der Fraktion, die bei pH 3,0 und pH 5,0 um 15 min sowie bei pH 2,0 um 7 min gesammelt wurde Aufgrund der guten Trenneigenschaften von phosphorylierten und dephosphorylierten Peptiden sowie der geringen Destabilisierung der P-N Bindung wurde als ERLIC-Puffer A im Folgenden 20 mM NaMePO₄ in 70 % ACN eingestellt auf pH 3,0 verwendet.

Um die Effektivität der Anreicherung mittels ERLIC an komplexeren Probe zu testen, wurde zunächst ein pHis-BSA Verdau herangezogen. Insgesamt wurden zwölf Fraktionen anhand der Signale des UV-Chromatogramms gesammelt. Von jeder Fraktion wurde 1 % des Volumens mittels 60 minütiger LC-MS Analyse analysiert und anschließend gegen die ISAS-Standarddatenbank mit dem angepassten ptmRS-Skript gesucht (siehe Abbildung 4-28).

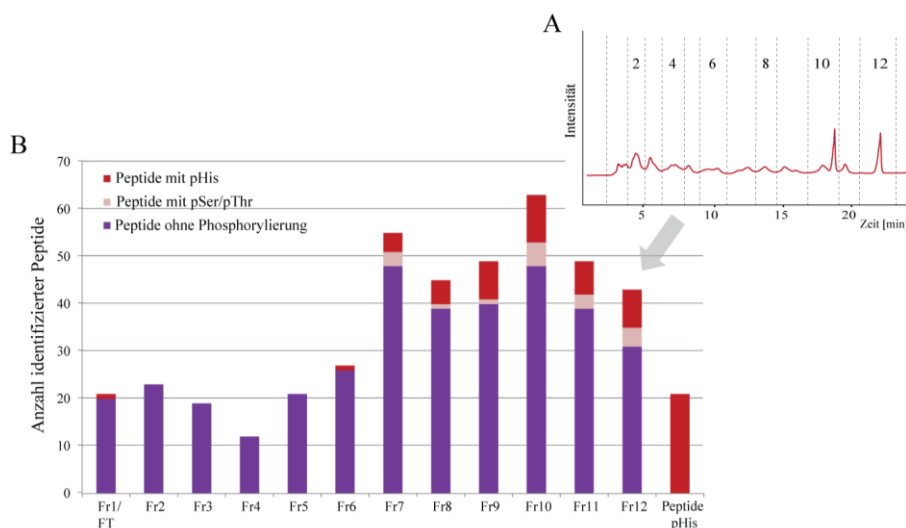


Abbildung 4-28: Nachweis von pHis-Peptiden in pHis-BSA nach ERLIC-Fraktionierung. (A) UV-Chromatogramm und Fraktionierungsschema von 20 µg pHis-BSA mit angepasstem ERLIC-Puffer A bei pH 3,0. (B) Ergebnis der LC-MS Analyse und Datenbanksuche der Fraktionen mittels Mascot und ptmRS (ptmRS Wert ≥ 90 %).

Sowohl N- als auch O-phosphorylierte Peptide eluierten ab einer Retentionszeit von etwa 9 min (ab Fraktion 6). Aufgrund der ansteigenden Konzentration des in ERLIC-Puffer B enthaltenen TEAP

wurden die Fraktionen lediglich bis 23 min (Fraktion 12) analysiert. TEAP konnte mittels Festphasenextraktion nicht vollständig aus der Probe entfernt werden, sodass es neben einer deutlich verschlechterten Auflösung zu Blockaden der Vorsäule kam.

Obwohl die Spezifität der Anreicherung für pHis, d.h. Peptide mit pHis gegen die Gesamtzahl an Peptiden, lediglich zwischen 4 % für Fraktion 6 und 19 % für Fraktion 12 lag, konnten 21 Peptidsequenzen mit pHis (ptmRS-Wert ≥ 90 %) detektiert werden. Somit waren 13 Phosphohistidine in BSA nachweisbar, während bei der direkten Messung nur 11 Phosphohistidine der 17 möglichen Histidine als phosphoryliert nachgewiesen werden konnten. Durch die größere Probenmenge im Vergleich zu der direkten LC-MS Messung (20 μg statt 16 ng) und die Fraktionierung der Probe konnte zudem die Anzahl an identifizierten Phospho-PSM von durchschnittlich weniger als 2 PSM pro Peptid (maximal 3 PSM pro Peptid) auf durchschnittlich 9 PSM pro Peptid (maximal 31 PSM pro Peptid) deutlich erhöht werden.

4.4.4.2. Direkter Nachweis endogener pHis in *E. coli*

Das angepasste ERLIC-Verfahren wurde im Folgenden zur Messung endogener pHis in *E. coli* eingesetzt. Um 400 μg *E. coli* Verdau pro Ansatz fraktionieren zu können, wurde eine Säule mit größerem Innendurchmesser (4,6 mm statt 2,1 mm) gewählt und der Gradient sowie die Flussrate entsprechend angepasst. Die Fraktionierung erfolgte in ein- bis zweiminütigen Fraktionen (siehe Tabelle 3-15). Zwei der vier Ansätze wurden, wie auch bei den SCX-basierten Trennungen, vor der Auftrennung mit Säure (1 % TFA für 60 min bei 60 °C) behandelt, um Negativkontrollen zu generieren (siehe Abbildung 4-29).

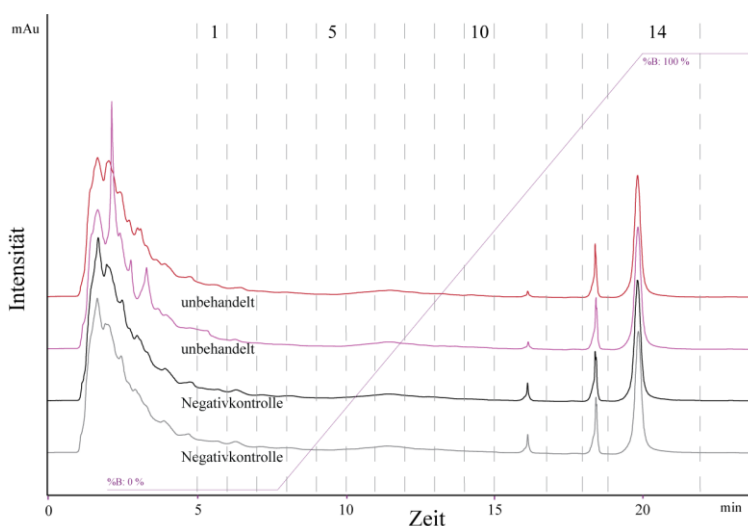


Abbildung 4-29: Auftrennung der *E. coli* Verdau mittels ERLIC. Es wurden jeweils zwei unbehandelte Proben (rot/lila) und zwei mit Säure behandelte Proben (Negativkontrollen, schwarz/grau) zu je 400 μg aufgetrennt. Von jeder Probe wurden 14 Fraktionen, bis 22 min, gesammelt.

Die Analyse der phosphorylierten Peptide erfolgte nach einer C18-Entsalzung jeder Fraktion mittels 60 minütiger LC-MS Analyse, in der eine nano-LC mit TFA/FA-Standardpuffersystem gekoppelt an ein QExactive Massenspektrometer eingesetzt wurde. Wie in den Vorversuchen wurden bei höheren Anteilen des ERLIC-Puffers B, hier in Fraktion 14, trotz Entsalzung, eine Schädigung der HPLC-Säulen beobachtet, sodass diese Fraktion nicht gemessen werden konnte. Unter Verwendung der *E. coli* K12 UniProt-Datenbank wurden in den beiden Replikaten 33 phosphorylierte Peptidsequenzen mittels LC-MS/MS Analyse identifiziert, die nicht in den Negativkontrollen detektiert wurden und von denen 25 Sequenzen basierend auf der Zuweisung über ptmRS eine Histidinphosphorylierung aufwiesen (siehe Tabelle 4-4).

Tabelle 4-4: Gesamtübersicht der mittels ERLIC identifizierten pHis-Peptidsequenzen aus *E. coli*. pHis Sequenzen mit ptmRS-Wert ≥ 90 %; * = Sequenzen mit pHis Phosphorylierungsstellen, die in der Datenbank UniProt aufgeführt sind; # = N-terminale Acetylierung.

Peptidsequenz	Protein Accession	ptmRS-Wert	pStelle Protein	Ion Score	Proteinname
EEGTRLDDLRIAHWVG QGATISDR	P0A7T3	H13(Phos): 97.28	H59	15	30S ribosomal protein S16
GIVEEGHKIK*	P0AEC3	H7(Phos): 100	H717	14	Aerobic respiration control sensor protein (arcB)
#HTMIHEQTR	P0ABH7	H1(Phos): 98.3	H111	14	Citrate synthase (gltA)
HVVRMPDGSLLNR	P62601	H1(Phos): 100; S9(Phos): 100	H271	11	Cytoplasmic trehalase (treF)
HLTEMVRQHK	P0C8K0	H9(Phos): 98.17	H3	11	D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit (kbaZ)
IGEVHDGAATMDWME QEQR	P0A6M8	H5(Phos): 99.98	H44	37	Elongation factor G (fusA)
#MKPTSVIIMDTHPIR	P0AEL8	T11(Phos): 99.75; H12(Phos): 100	H12	14	Fimbriae Z protein (fimZ)
EAALVHEALVAR	P0A6T5	H6(Phos): 100	H12	31	GTP cyclohydrolase 1 (folE)
HMDDIISGEFSSGMMAD WANDDKK	P05793	H1(Phos): 98.61	H303	21	Ketol-acid reductoisomerase (NADP(+)) (ilvC)
HGIKVLVGER	P08201	H1(Phos): 100	H72	23	Nitrite reductase (NADH) large subunit (nirB)
MGSTGIGNGIAIPHGK*	P69829	H14(Phos): 100	H43	63	Nitrogen regulatory protein (PTS system EIIA component, ptsN)
MGSTGIGNGIAIPHGKLE EDTLR*	P69829	H14(Phos): 100	H43	33	Nitrogen regulatory protein (PTS system EIIA component, ptsN)
LAPHLRER	P76187	H4(Phos): 100	H72	14	Oxidoreductase (ydhF)

Ergebnisse

#HTEALGELTR	P00864	H1(Phos): 99,02	H402	27	Phosphoenolpyruvate carboxylase (ppc)
TCHAAIIAR*	P23538	H3(Phos): 100	H421	29	Phosphoenolpyruvate synthase (ppsA)
TSHTSIMAR*	P08839	H3(Phos): 100	H189	42	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase (ptsI)
DGAANSHAAIMVR*	P37177	H7(Phos): 100	H356	73	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase (ptsP)
LQHIMFAR	P76245	H3(Phos): 100	H52	13	Probable diguanylate cyclase (yeaP)
LTPTYLGESIAVPHGTVE AK*	P00550	H14(Phos): 100	H554	34	PTS system mannitol-specific EIICBA component (mtlA)
GAEIVVHMGIDTVALEG K*	P09323	H7(Phos): 100	H569	77	PTS system N-Acglucosamine-specific EIICBA component (nagE)
DEVLHSLPR	P36767	H5(Phos): 100; S6(Phos): 100	H113, S114	11	Recombination-associated protein (rdgC)
#HILGLDHK	P68191	H1(Phos): 100	H9	25	Stationary-phase-induced ribosome-associated protein (sra)
MGHAGAIAGGK*	P0AGE9	H3(Phos): 100	H247	65	Succinyl-CoA ligase (sucD)
RMGHAGAIAGGK*	P0AGE9	H4(Phos): 100	H247	75	Succinyl-CoA ligase (sucD)
#IYLVWAHPR	P43340	Y2(Phos): 100; H7(Phos): 100	H12	11	Uncharacterized NAD(P)H oxidoreductase (ycaK)

Zehn dieser Phosphopeptidsequenzen enthielten acht Phosphorylierungsstellen, die bereits in der Datenbank UniProt aufgeführt waren. Insgesamt konnten 22 unterschiedliche Phosphorylierungsstellen an Histidin identifiziert werden. In Abbildung 4-30 A sind exemplarisch die detektierten MS/MS Spektren der bekannten pHis-Peptide TcpHAAIIAR aus PpsA (H421) sowie TSpH₁₈₉TSIMAR aus ptsI (H189) gezeigt.

Die geringe Abundanz der endogenen pHis-Peptide in *E. coli* trug zu der geringen Intensität und damit zu einer geringen Qualität der MS/MS Spektren bei und erschwerte so die Lokalisierung der Phosphorylierungsstellen. In insgesamt 25 der 33 Peptidsequenzen konnte die Phosphorylierung mittels ptmRS eindeutig Histidin zugeordnet werden, eine Phosphorylierung wurde pThr zugewiesen und bei weiteren sieben Peptidsequenzen erfolgte keine eindeutige Zuordnung. Darunter war auch die bekannte Phosphorylierungsstelle H184 der *2,3-Bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase* (P62707), deren korrespondierendes Peptid als vierfach geladenes Ion vorlag (ptmRS-Wert: H10(Phos): 50; S13(Phos): 50) und auch nach manueller Validierung nicht eindeutig zugeordnet werden konnte.

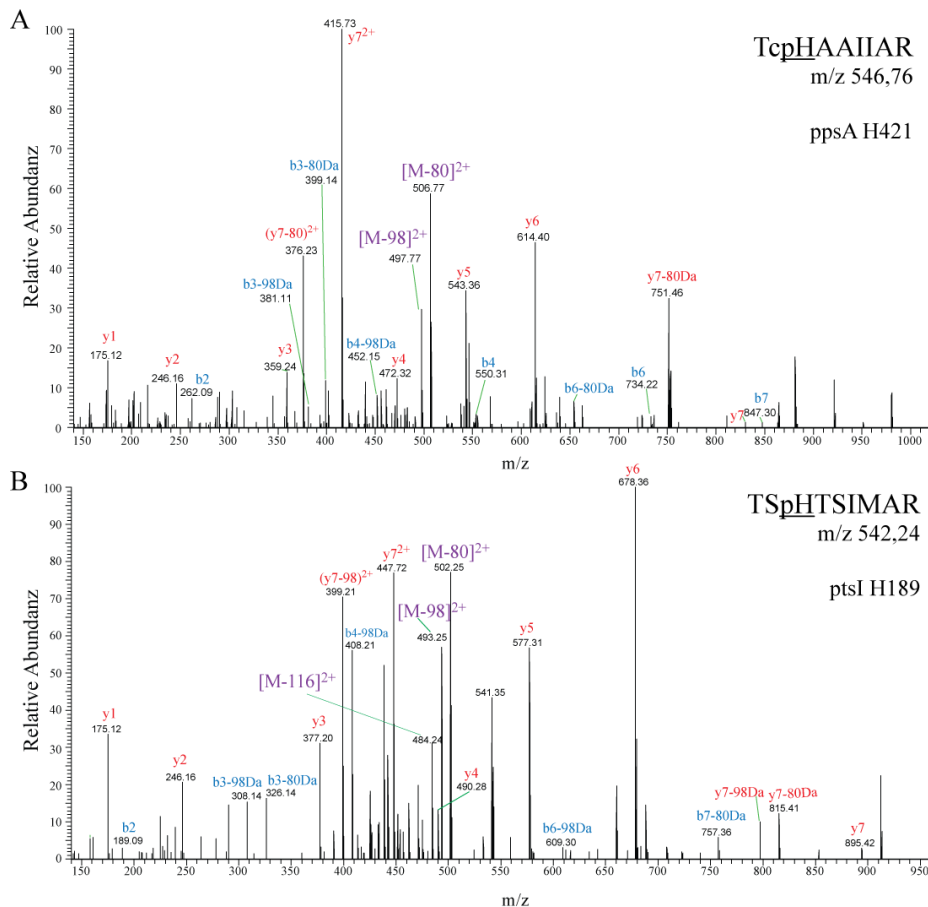


Abbildung 4-30: MS/MS Spektren von identifizierten pHis-Sequenzen aus *E. coli*. (A) MS/MS Spektrum der Peptide TcpHAAIIAR aus ppsA (P23538) sowie (B) TSpHTSIMAR aus ptsI (P08839) nach HCD-Fragmentierung.

Das angepasste ERLIC-Protokoll stellt die erste Chromatographie-basierte Strategie zur Anreicherung von endogenen pHis aus komplexen Proben dar. Aus insgesamt 800 μg *E. coli* Proteinverdau konnten so zehn Peptidsequenzen mit bekannten Phosphorylierungsstellen sowie weitere 15 Sequenzen mit bislang unbekanntem pHis direkt nachgewiesen werden. Eine Untersuchung der zugehörigen Phosphoproteine und ihrer Funktionen mittels der Software STRING zeigte, dass fünf der Proteine dem PEP-PTS System zugeordnet werden können: ptsI, nagE, PtsN, ptsP sowie mtlA (p-Wert $1,3 \cdot 10^{-2}$) sowie 8 Proteine, darunter die genannten sowie sucD, ppsA und arcB an „Phosphorylierungsreaktionen“ (p-Wert $1,3 \cdot 10^{-2}$) beteiligt sind. Alle identifizierten Proteine sind zudem in Stoffwechselprozessen angereichert (p-Wert $1,8 \cdot 10^{-2}$).

Sechs Phosphopeptidsequenzen konnten sowohl mittels ERLIC-Fraktionierung als auch mit dem indirekten SCX-Verfahren nachgewiesen werden: neben ptsI, sucD, ppsA, ptsP und ptsN war dies die Sequenz pHTALGELTR aus der PEP Carboxylase (ppc), in der nach ERLIC-Anreicherung eine Phosphorylierung an H402 identifiziert wurde. Die PEP Carboxylase stellt einen interessanten neuen

Kandidaten für eine Histidinphosphorylierung dar, da ppc Phosphoenolpyruvat in Oxalacetat umwandelt und somit an einem wichtigen Knotenpunkt des *E. coli* Stoffwechsels eingreift, der das PEP-PTS System und somit die Aufnahme von Glukose beeinflusst [151].

5. Diskussion

5.1. Charakterisierung und Optimierung des Phosphoproteinverdau

Im Hinblick auf die spätere quantitative Charakterisierung endogener Phosphorylierungsmuster war es wichtig, die Verdaueffizienz von Trypsin zu evaluieren und zu optimieren. Ein unvollständiger Verdau führt insbesondere bei absoluten Quantifizierungen, z. B. bei zielgerichteten Analysen oder bei der Bestimmung der Stöchiometrie von Proteinkomplexen, zu Problemen, da die eigentliche Abundanz der Proteine auf Basis der generierten Peptide unterschätzt wird. Zudem war es wichtig, einen reproduzierbaren Verdau zu etablieren, da unabhängig voneinander durchgeführte Experimente verglichen werden sollten.

Für qualitative und quantitative *large-scale* Analysen wurde ein Verhältnis von 1:20 (w/w) von Trypsin zur Proteinmenge bei einer Inkubation mit der Probe in 50 mM ABC, pH ~8, für 16 h bei 37 °C als optimal im Hinblick auf die Anzahl voll tryptischer Phospho-PSM und Phosphorylierungsstellen bestimmt. Obwohl sich der Zusatz von 5 % TFE zum Verdauopuffer positiv auf die Verdaueffizienz einzelner Phosphopeptidsequenzen auswirkt, zeigten weitere Untersuchungen, dass ein Verlust der Sensitivität, vermutlich durch die Beeinflussung der Bindung der phosphorylierten Peptide an die Titandioxidpartikeln, bei der Phosphopeptidanreicherung auftrat und daher nicht für Phosphoproteomstudien geeignet ist. Diese Beobachtung konnte erst auf Basis von markierungsfreien Analysen gemacht werden, da sich dieser Verlust bei den iTRAQ-basierten Quantifizierungen durch die Vereinigung der Probe vor der Phosphopeptidanreicherung auf alle Verdaubedingungen gleich auswirkte. Hierbei zeigte sich, dass auch sorgfältig geplante Evaluierungsstudien durch systematische Fehler beeinträchtigt werden können.

Im Blick auf die Spezifität des Trypsins und die Verdaueffizienz war es wichtig, ein hochwertiges Trypsin zu verwenden. Bei der verwendeten, hoch aufgereinigten und chemisch stabilisierten Protease Trypsin *Gold MS grade* konnte bei einem Trypsin/Peptid-Verhältnis von 1:10 (w/w) kein signifikanter Anstieg an nicht tryptischen und semitryptischen Phosphopeptiden mit einer angepassten Datenbanksuche ermittelt werden. Die Unterschiede in der Güte kommerziell erhältlicher Trypsine und mögliche Auswirkungen auf den Verdau von nicht modifizierten Sequenzen wurden bereits von Burkhardt *et al.* [46] sowie Walmsley *et al.* [152] umfassend analysiert.

Es zeigte sich, dass trotz Optimierung der Reaktionsbedingungen „resistente“ Phosphopeptidsequenzen vorliegen, die lediglich zu einem geringen Anteil in die voll tryptische Form gespalten werden. Grundsätzlich korrelierte dieser Anteil mit dem Abstand der Phosphorylierungsstelle von der Schnittstelle des Trypsins. Jedoch war der Anteil auch stark abhängig von der phosphorylierten Aminosäure und der Aminosäuresequenz insgesamt. Die Verdaueffizienzen der phosphorylierten Modellpeptide machten deutlich, dass pTyr einen geringeren Einfluss auf die Effizienz ausübt als pThr

oder pSer. Um einen ersten Einblick in die zugrundeliegenden Prozesse zu erhalten, wurden mittels der Software PEP-FOLD [153] Strukturvorhersagen erstellt, die die Konformation der Peptide AAAR|LSLTDPLVAER sowie QQR|R|GSLPEISNLR vor und nach Phosphorylierung darstellen (siehe Abbildung 5-1).

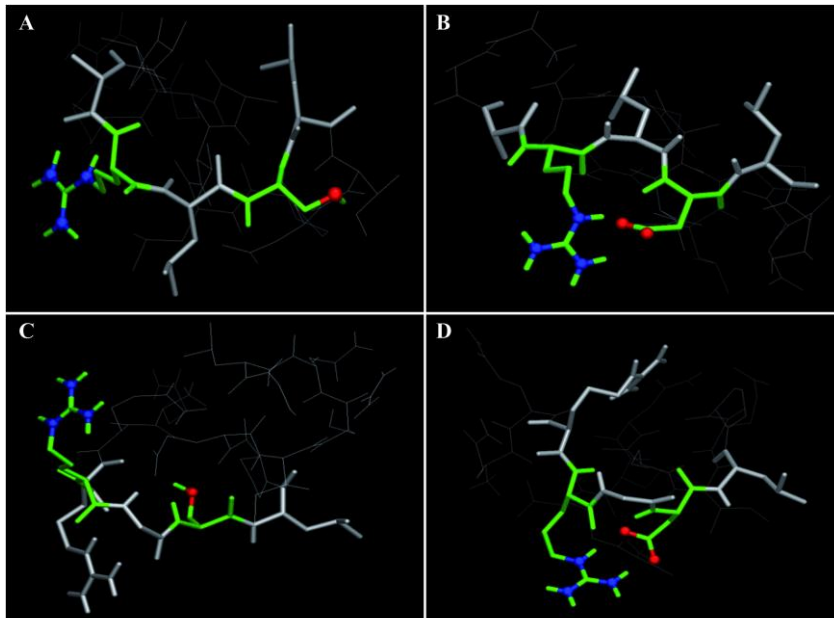


Abbildung 5-1: Visualisierung der Konformationsänderung von Peptidsequenzen nach Phosphorylierung. (A) Vorhergesagte Konformation von AAAR|LSLTDPLVAER vor und (B) nach Phosphorylierung an P2' (pSer nachgeahmt durch Aspartat). (C) QQR|R|GSLPEISNLR vor und (D) nach Phosphorylierung an P2'. Gezeigt sind die Vorhersagen mit dem höchsten Score aus der Software PEP-FOLD. Die Strukturvorhersagen deuten auf eine räumliche Annäherung der phosphorylierten Aminosäure und der positiv geladenen Seitenketten von Arg hin. Relevante Aminosäuren wurden blau (Stickstoff) bzw. rot (Sauerstoff) markiert.

Basierend auf diesen *in silico* Vorhersagen erfolgt nach Phosphorylierung der Sequenzen eine Konformationsänderung, die zu einer Annäherung der Seitenketten von Arg und pSer führt. Die räumliche Nähe könnte die Ausbildung einer Salzbrücke begünstigen und so die Zugänglichkeit der potentiellen tryptischen Schnittstelle beeinträchtigen. Phosphotyrosin konnte in der Software nicht nachgeahmt werden, sodass nur die Vermutung aufgestellt werden kann, dass bei pTyr aufgrund des starren aromatischen Rings nur eine eingeschränkte Konformationsänderung der Peptidsequenz in wässrigen Lösungen nach Phosphorylierung vorliegt und somit Trypsin ein besserer Zugang zur Schnittstelle ermöglicht wird.

Um die Hypothese der Bildung einer Salzbrücke bei pSer bzw. pThr an P2' und P3' zu überprüfen, wurde exemplarisch ein tryptischer Verdau der „resistenten“ Phosphopeptidsequenz AAAR|LpSLTDPLVAER in 100 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer bei einem Trypsin/Peptid-Verhältnis von 1:50 (w/w) durchgeführt. Der hohe Salzanteil des Verdaupuffers sollte dazu dienen, die Ausbildung einer Salzbrücke zu verhindern, indem das Salz in Konkurrenz mit der positiven Ladung der Seitenkette von

Arginin tritt und somit die Interaktion mit der Phosphatgruppe einschränkt. Als Verdauungskontrolle wurde die nicht modifizierte Sequenz mitgeführt, die unter diesen extremen Bedingungen vollständig verdaut wurde. Die Ergebnisse des Verdauens von AAAR|LpSLTDPLVAER konnten die Hypothese einer Salzbrücke nicht bestätigen. Durchschnittlich wurden lediglich 2 % des „resistenten“ phosphorylierten Peptids zu der voll tryptischen Variante verdaut, sodass keine veränderte Interaktion der Phosphatgruppe und der Seitenkette von Arginin vorzuliegen scheint. Allerdings sollten weitere Untersuchungen erfolgen, um dieses vorläufige Ergebnis zu unterstützen.

In der Literatur, u.a. bei Swaney *et al.* [154], wurden bereits die Vorteile einer Kombination unterschiedlicher Proteasen zur Proteincharakterisierung sowie für eine möglichst umfassende Abdeckung des Proteoms beschrieben, jedoch liegen bisher keine quantitativen Daten in Bezug auf den Verdau einzelner Sequenzen mit diesen Proteasen vor. Für einen initialen Vergleich mit der Verdaueffizienz von Trypsin wurden daher drei „resistente“ Modellpeptide ausgewählt und mit Arg-C *Sequencing grade* (Promega) im Enzym/Peptid-Verhältnis 1:100 bzw. 1:50 (w/w) verdaut (siehe Tabelle 5-1).

Tabelle 5-1: Verdaueffizienz ausgewählter Modellpeptide mit Arg-Schnittstelle bei Verdau mit Arg-C. Pro Peptid wurde 1 µg in 50 mM ABC über 16 h verdaut (Duplikate).

Peptidsequenz	„Voll verdautes“ Fragment	1:100 (w/w) Verdaueffizienz (RSD)	1:50 (w/w) Verdaueffizienz (RSD)
AAAR LpSLTDPLVAER	LpSLTDPLVAER	34,3 % (3,1 %)	96,5 % (2,5 %)
AAAR LpTLTDPLVAER	LpTLTDPLVAER	60,1 % (6,3 %)	99,6 % (0,2 %)
AAAR LpYLTDPVAER	LpYLTDPVAER	84,2 % (0,8 %)	98,6 % (1,9 %)

Im Gegensatz zum tryptischen Verdau wurden mittels Arg-C auch die „resistenten“ Peptidsequenzen mit pSer bzw. pThr an P2' bei einem Enzym/Peptid-Verhältnis von 1:50 (w/w) nahezu vollständig verdaut. Diese vielversprechenden Ergebnisse könnten insbesondere im Hinblick auf absolute Quantifizierungen einzelner Proteinkomplexe sehr hilfreich sein. Die Anwendbarkeit in *large-scale* Analysen ist aufgrund der Spezifität für nur eine Aminosäure im Vergleich zu Trypsin allerdings eingeschränkt, da die generierten, längeren Peptidsequenzen mittels CID- bzw. HCD-Fragmentierung schlecht fragmentieren und somit die entstehenden Fragmentionen oft nicht ausreichen, um die Phosphoaminosäure verlässlich zu lokalisieren.

Einen alternativen Ansatz könnte ein Verdau mit der Protease Subtilisin darstellen, welche eine breite Spezifität hat [155]. Obwohl Subtilisin innerhalb einer Sequenz an verschiedenen Positionen schneiden kann und somit nicht für die absolute Quantifizierung geeignet scheint, konnte eine gute Sensitivität bei

einer Phosphoproteomanalyse von HeLa-Zellen im Vergleich zu einem tryptischen Verdau aufgezeigt werden [156]. Die geringe Überlappung der mittels beider Proteasen identifizierten Phosphorylierungsstellen von unter 20 % stellt zudem eine interessante Möglichkeit dar, bisher unbekannte Phosphorylierungen zu detektieren, die aufgrund einer schlechten Zugänglichkeit für Trypsin nicht nachgewiesen wurden. Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse, sind weitere Studien zur Bestimmung der Verdaueffizienz sowie zur Anwendbarkeit von Subtilisin in quantitativen Studien notwendig.

5.2. Optimierung der Phosphopeptidanreicherung

Wie bei dem Vergleich unterschiedlicher Protokolle für die Titandioxid-basierte Anreicherungen von Phosphopeptiden deutlich wurde (siehe Kapitel 4.1), führte zum einen der Zusatz von 1 M Glykolsäure zum stark sauren Ladepuffer mit 5 % TFA in 80 % ACN und zum anderen die erneute Inkubation des Eluats der ersten TiO₂-Anreicherung mit frischen Titandioxidpartikeln in einem zweiten Durchgang des Protokolls zu einer deutlichen Steigerung der Sensitivität sowie Spezifität der Phosphopeptidanreicherung auf mehr als 80 % im Verfahren IIc. Die höhere Spezifität lässt sich auch durch die sequentiellen Waschschrte mit abnehmendem Anteil an Organik abklären, in denen unspezifisch an die Partikel oder andere Oberflächen gebundene, nicht phosphorylierte Peptide entfernt werden. Zudem wurde eine selektive Anreicherung durch die niedrigen Verhältnisse von Titandioxidpartikeln zur Peptidmenge, von 6:1 (w/w) und weniger, unterstützt, wohingegen in publizierten Protokollen Verhältnisse von bis zu 150:1 (w/w) verwendet wurden [89]. Bereits 2009 konnte von Li *et al.* [157] gezeigt werden, dass bei der Anreicherung von Phosphopeptiden aus einem HeLa-Lysat sowohl die höchste Anzahl an Phosphopeptiden als auch die höchste Spezifität bei einem Partikel/Peptid-Verhältnis zwischen 4:1 und 6:1 (w/w) vorlag.

Wie in Kapitel 4.1 beschrieben, war auch eine Anpassung des Verfahrens auf Probenmengen $\leq 20 \mu\text{g}$ durch die Verwendung von selbst gepackten Filterspitzen mit Titandioxidpartikeln möglich [135]. Ein Nachteil war jedoch, dass die Aufarbeitung in Filterspitzen zusätzliche manuelle Schritte, wie das Waschen der TiO₂-Partikel mit GELoader Spitzen, erforderte. Somit wurde ab Proteinmengen $\geq 20 \mu\text{g}$ bis zu mehreren Milligramm das Protokoll in Eppendorfgefäßen bevorzugt, welches eine parallele, schnelle und reproduzierbare Anreicherung von bis zu 24 Proben in einer handelsüblichen Zentrifuge (Probenanzahl abhängig von Kapazität der Zentrifuge) ermöglicht.

Die hohe Sensitivität dieses Protokolls wurde durch die hohe Anzahl an Phosphopeptidsequenzen pro μg unterstrichen, die für die Anreicherung von 100 μg HeLa-Lysat bei etwa 22 Phosphopeptidsequenzen pro μg lag. Dieser Wert wie auch die Werte in bereits publizierten Übersichtstabellen [158], in denen durchschnittlich 1-5 phosphorylierte Sequenzen pro μg für verschiedene Strategien aufgelistet sind, sind

mit Vorsicht zu betrachten, da sie stark von der eingesetzten Startproteinmenge, der analysierten Spezies sowie der Anreicherungsstrategie abhängen. Zudem gibt es starke Schwankungen in der Genauigkeit der zur Bestimmung von Probenmengen verwendeten Verfahren, sodass verlässliche Vergleiche lediglich mit einer aufwendigen, aber genauen Aminosäureanalyse durchgeführt werden sollten. Auch ist entscheidend, ob eindimensionale oder mehrdimensionale Anreicherungsstrategien, wie das in dieser Arbeit etablierte zweidimensionale TiO₂-HILIC-Verfahren, eingesetzt wurden.

Bereits der Vergleich der Anreicherung von 50 µg und 100 µg Probe gleichen Ursprungs und mit dem gleichen Protokoll zeigte die Notwendigkeit eines mehrdimensionalen Ansatzes, da die Anzahl an identifizierten Phosphopeptiden trotz doppelter Startmenge nahezu konstant blieb (siehe Abbildung 4-3). Dieser Effekt ist höchstwahrscheinlich durch die „undersampling“ genannte Limitierung der anschließenden MS Messung erklärbar, die bei einer datenabhängigen Akquisition (DDA) aufgrund der limitierten Geschwindigkeit des MS und der kurzen Halbwertsbreite eines chromatographischen Peaks auftritt und dazu führt, dass niedrig abundante Phosphopeptide im Vergleich zu abundanten Peptiden unterrepräsentiert werden. Es zeigte sich, dass bei Proteinmengen ≥ 100 µg eine HILIC-Fraktionierung zu einer Zunahme identifizierter Phosphopeptidsequenzen führte, die in dem durchgeführten Versuch bei 42 % gegenüber der reinen TiO₂-Anreicherung von 200 µg HeLa-Verdau lag. Eine Optimierung des HILIC-Gradienten und eine stärkere Fraktionierung der Proben durch kürzere Zeitintervalle pro Fraktion erhöhte die Sensitivität nochmals. 2D-Verfahren, die zunächst eine Fraktionierung der Probe mittels ERLIC und eine anschließende Festphasenextraktion der Fraktionen mittels RP oder SCX vorsehen, gehören momentan zu den sensitivsten, publizierten Protokollen mit mehr als 75 Phosphorylierungsstellen pro µg [119]. Allerdings ist die Handhabbarkeit dieser Verfahren durch die manuelle Entsalzung der nach ERLIC-Auftrennung gesammelten Fraktionen, in dieser Studie 21 Fraktionen, stark eingeschränkt, solange dieser Schritt nicht automatisiert werden kann. Im Gegensatz dazu können die mittels HILIC gesammelten Fraktionen unter Vakuum eingetrocknet und direkt für die RP-LC-MS Analyse verwendet werden.

Die Anwendung des etablierten TiO₂-HILIC-Verfahrens in Kombination mit einer Stabil-Isotopenmarkierung für die relativen Vergleiche der Phosphorylierungszustände in CLL-Zellen führte zur Quantifizierung von durchschnittlich 10.200 Phosphopeptidsequenzen pro iTRAQ-Datensatz (940 µg Proteinmenge), was 11 Phosphopeptiden pro µg entspricht. In einer LC-MS basierten Studie von O'Hayre *et al.* [73] konnten nach Stimulation der CLL-Zellen mit dem Chemokin CXCL12 etwa 700 Phosphoproteine nachgewiesen werden, während in dieser Arbeit insgesamt 2854 Phosphoproteine quantifiziert wurden. Nach aktuellem Kenntnisstand stellt die in dieser Arbeit durchgeführte Studie die umfangreichste Analyse des Phosphoproteoms von CLL-Zellen bislang dar.

Der Verlust an Sensitivität gegenüber markierungsfreien Ansätzen ist vor allem auf eine generell zu beobachtende verringerte Konversionsrate (Verhältnis PSM zu MS/MS Spektren) bei Experimenten mit

stabil-Isotopen markierten Peptiden zurückzuführen, welche u.a. durch eine erhöhte Ladung iTRAQ markierter Peptide zu erklären ist, die wiederum zu einer schlechteren Detektion im MS führt. Die Zuleitung von Ammoniumdämpfen während der Ionisation kann diesen Effekt zwar teilweise kompensieren, jedoch nicht aufheben, sodass die Effizienz der Identifizierung beeinträchtigt bleibt [159].

Die Ergebnisse der Optimierung des Phosphoproteinverdau sowie die Probleme, die bei der Aufarbeitung der CLL-Zellen auftraten, zeigen, dass es keinen universellen Ansatz für die Probenaufarbeitung unterschiedlicher Zelltypen geben kann [160]. Bereits eine Veränderung des Lysepuffers kann weitere Anpassungen des Protokolls nach sich ziehen, wie die Einführung zusätzlicher Waschschrte in das FASP-Protokoll, um weiterhin eine sensitive Anreicherung der Phosphopeptide zu ermöglichen. Theoretisch muss die Aufarbeitung für jede Probenart Schritt für Schritt und systematisch optimiert werden, was allerdings aufgrund des massiven Arbeits-, Proben- und Kostenaufwands nur für „Hochdurchsatz-Projekte“ realisierbar ist. Daher ist für eine erfolgreiche Proteomanalyse die Einführung von Qualitätskontrollen entscheidend, um Probleme frühzeitig zu erkennen. Diese sollten wie folgt durchgeführt werden: (i) auf Ebene der Probenaufarbeitung, durch die Überprüfung der Reproduzierbarkeit des Verdau, idealerweise über monolithische LC-Trennungen, (ii) auf Ebene der Phosphopeptidanreicherung, durch das Hinzugeben von Referenz-Phosphopeptiden vor der Anreicherung, (iii) für das LC-MS System, durch Einführung von laborinternen Standards zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit und Sensitivität sowie (iv) bei der Datenauswertung, durch die Bestimmung von Normalisierungsfaktoren der zu vergleichenden Proben auf Proteinebene, um Fehler bei der Probenaufarbeitung, wie Ungenauigkeiten bei der Pipettierung, zu kompensieren.

5.3. Aktuelle Herausforderungen bei klinischen Fragestellungen - am Beispiel der CLL

Die chronische lymphatische Leukämie stellt eine sehr heterogen verlaufende Leukämieform dar [57]. Obwohl eine Einteilung der Patienten in eine milde und eine aggressive Form der Erkrankung anhand von klinischen Marken möglich ist, liegen unzureichende Informationen darüber vor, welche weiteren Unterschiede im Proteinexpressions- sowie im Phosphorylierungsmuster zwischen den beiden prognostischen Gruppen bestehen. Interessant war in diesem Zusammenhang auch das Ansprechen der CLL-Zellen auf einen aktivierenden Stimulus sowie auf den BTK-Inhibitor Ibrutinib, der für die CLL-Therapie von der FDA als Medikament zugelassen wurde.

Burkhart *et al.* [3] konnten zeigen, dass eine umfassende quantitative Analyse des Proteoms von aus Frischblut isolierten Thrombozyten aus wenigen µg Zellmaterial mittels LC-MS basierten Studien

erfolgen kann. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit lagen keine vergleichbaren Daten des Proteoms von CLL-Zellen vor, sodass zunächst eine Validierung bekannter klinischer Marker mittels LC-MS erfolgte. Für das in dieser Arbeit etablierte Protokoll wurde für die parallele Analyse von quantitativen Veränderungen auf Phosphoproteom- sowie Proteomebene pro Stimulationsbedingung lediglich eine Proteinmenge von 120 µg pro Stimulationsbedingung eingesetzt. Trotz der hohen Heterogenität der Patientenproben konnte auf Ebene der Phosphoproteine eine Schnittmenge von 55 % zwischen den drei iTRAQ-Datensätzen erreicht werden. Ein Vergleich mit einem proteomischen Datensatz aus Hefe zeigt, dass auch bei Dreifachmessung eines reinen Proteinverdaus weniger als 60 % der Proteine in allen drei Replikaten überlappen [161], sodass der ermittelte Wert von einer hohen Reproduzierbarkeit des etablierten Verfahrens zeugt. Die relativ geringen Schnittmengen sind auf das angesprochene „*undersampling*“ sowie Varianzen in den chromatographischen Trennungen zurückzuführen.

Der generierte Datensatz mit mehreren tausend Einträgen machte auch deutlich, wie entscheidend, neben einer verlässlichen Datenbanksuche, die korrekte Lokalisierung der Phosphorylierung sowie eine statistische Auswertung der Daten ist. Für den Nachweis differentieller Phosphorylierungsstellen ist es zudem essentiell auch die Änderung auf Proteinebene zu kennen, die aufgrund von veränderter Genregulation auftreten können [162]. Für die statistische Auswertung der Daten wurde der *moderated* t-test mit einem Signifikanzniveau von 5 % ($p \leq 0,05$) für einen Vergleich der Patientengruppen (je $n=3$) zwischen verschiedenen Stimulationsbedingungen eingesetzt, da dieser Test eine bessere Aussage über biologisch relevante Veränderungen in iTRAQ-Daten erbrachte, als der häufig verwendete Zweistichproben-t-Test [8, 137]. Insbesondere bei LC-MS basierten *Discovery*-Ansätzen, in denen meist nur eine kleine Anzahl an Stichproben pro Patientengruppe eingesetzt wird, bietet der *moderated t-test* einen ersten Ansatz zum Auffinden von Schlüsselkomponenten.

Aufbauend auf diesen Daten wurden Patientenkohorten mittels Western Blot Analysen untersucht, die keine spezielle Markierung der Zellen voraussetzen und mit geringem Zeitaufwand viele Patienten screenen können. Zudem können zielgerichtete massenspektrometrische Ansätze verwendet werden, um unabhängig von oft nicht verfügbaren oder wenig spezifischen Antikörpern differentielle Proteine zu validieren. Dies ist v.a. bezüglich der Validierung von Phosphorylierungsstellen mittels Western Blot von hoher Bedeutung, da neben der geringen Spezifität der Antikörper auch die relative Quantifizierung anhand der Bandenstärke relativ ungenau und stark personenabhängig ist. Zielgerichtete LC-MS Analysen stellen eine Alternative dar, die im Folgenden ebenfalls näher erläutert wird.

5.3.1. Validierung der iTRAQ-CLL-Daten

Aufgrund der hohen biologischen Varianz der Patienten war es wichtig, die Ergebnisse des iTRAQ-basierten *Discovery*-Ansatzes an einer größeren Patientenkohorte zu validieren. In diesen Studien fiel zunächst auf Proteinebene, neben bekannten klinischen Markern, das Protein MARCKS auf, das eine signifikant niedrigere Abundanz ($\downarrow -2,42$) in Zellen mit uIgVH-Zellen Genstatus aufwies und bereits an

einer größeren Patientenkohorte validiert werden konnte (siehe auch Kapitel 4.3.2). Zur Validierung weiterer Proteine sollten zielgerichtete MS/MS Analysen, PRMs, mit dem noch nicht verwendeten Zellysat etabliert werden. Hierzu wurden 20 µg der unbehandelten sowie mit anti-IgM stimulierten CLL-Patientenproben, die bereits für die iTRAQ-Messungen herangezogen worden waren, tryptisch mittels FASP verdaut. Als interne Referenz wurden je zwei Peptide von GAPDH und Talin, sogenannte *House-Keeping* Proteine bestimmt, die in den iTRAQ-Daten keine Unterschiede in den Patientengruppen aufwiesen. Für die PRM-Analyse auf Proteomebene wurden je 2 µg Verdau eingesetzt und pro Protein mindestens zwei Peptide analysiert (120 min LC-MS, QExactive MS mit *Inclusion list* 2+/3+, 7 min Retentionszeitfenster). Die Peptidsequenzen wurden anhand der iTRAQ-Daten und vorausgehender DDA-Messungen ausgewählt (siehe Tabelle 5-2).

Tabelle 5-2: Gewählte Peptidsequenzen für die PRMs auf Proteinebene. Zur Bestimmung des Regulationsfaktors (*fold change*) wurde der Median der Peakflächen der je drei Patienten (uIgVH bzw. mIgVH) gebildet und das Verhältnis zwischen den Gruppen bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den iTRAQ-Daten sind die \log_2 fold changes (fc) angegeben.

Proteinname	Accession	Peptidsequenz	uIgVH vs. mIgVH ($\log_2 fc$)
GAPDH	P04406	VGVNGFGR	0,2
		LISWYDNEFGYSNR	0,1
Talin	Q9Y490	ALEATTEHIR	-0,1
		TSTPEDFIR	-0,1
ZAP-70	P43403	LEGEALEQAIISQAPQVEK	4,4
		LIATTAHER	5,5
		ALGADDSYYTAR	4,3
MARCKS	P29966	EAPAEGEAAEPGSPTAAEGEAAS	-9,4
		AASSTSSPK	
		AEDGATPSPSNETPK	-7,0
Histon H1.5	P16401	ATGPPVSELITK	1,5
		ALAAGGYDVEK	1,4

Die Bestimmung der Peakflächen erfolgte mittels der Software Skyline und ist in Abbildung 5-2 pro Patientengruppe und Peptid in einem Box Plot über die Werte der jeweils drei Patienten dargestellt.

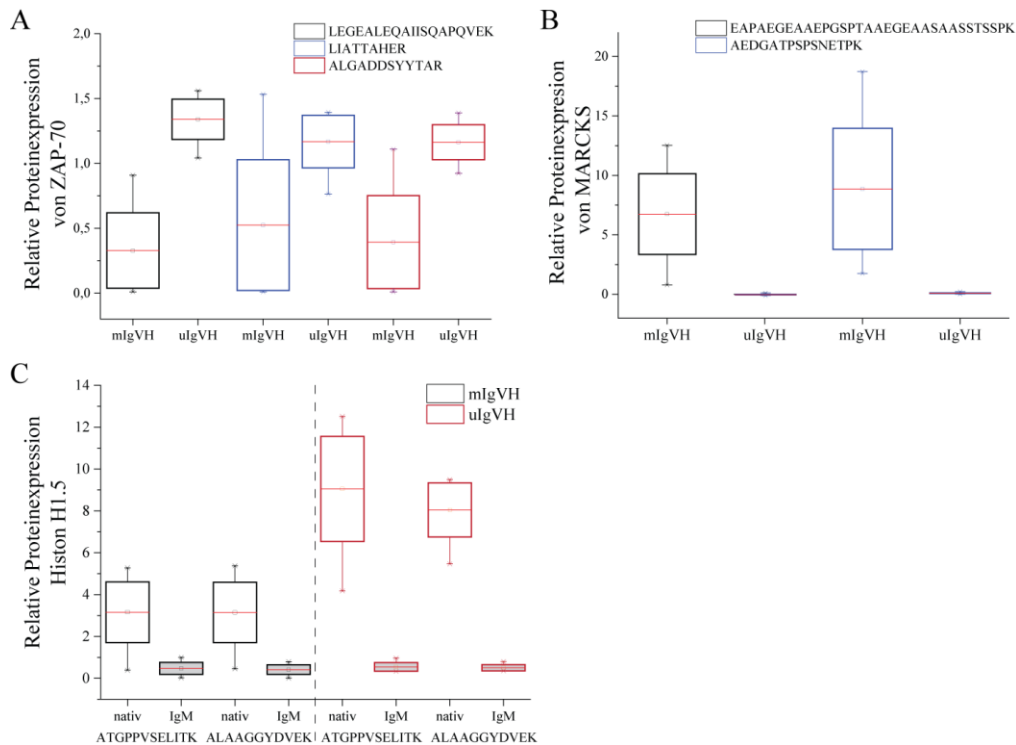


Abbildung 5-2: Validierung der Proteinabundanz mittels PRM. Die Abundanz von (A) ZAP-70, (B) MARCKS und (C) Histone H1.5 zwischen den Patientengruppen uIgVH und mIgVH (je n=3) bzw. mit und ohne IgM-Stimulation wurden mittels der Software Skyline verglichen. Der Median ist jeweils normiert als \log_2 dargestellt (rot).

Mittels PRM konnten die Ergebnisse der iTRAQ-Daten auf Proteinebene für die Proteine ZAP-70, MARCKS und Histone H1.5 validiert werden. Die im Vergleich zu den iTRAQ-Daten um ein Vielfaches höheren Regulationsfaktoren lassen sich durch die sogenannte „ratio compression“ bei iTRAQ markierten Peptiden aufgrund von Co-Fragmentierung im MS erklären, durch die die Verhältnisse der Reporterionen und somit die Regulationsfaktoren unterschätzt werden [163]. Die signifikante Abnahme des Levels von Histone H1.5 nach IgM-Stimulation stimmte mit den iTRAQ-Daten überein. Es erscheint wahrscheinlich, dass nach Stimulation der Zellen eine Modifizierung der gewählten Peptide induziert wurde und somit eine Detektion der Sequenzen der Histone aufgrund der Änderungen des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses nicht mehr möglich war. Zudem ist bekannt, dass Histone H1 eine Vielzahl hoch abundanter PTMs, wie Acetylierungen und Methylierungen, aufweist und der N-terminale Teil des Histons H1.4 zu den am stärksten posttranslational modifizierten Sequenzen in einer Zelle gehört [164].

Nach der erfolgreichen Anwendung des PRMs auf Proteinebene, sollte dieser Ansatz auch eine Alternative zum Western Blot für die Validierung von Phosphorylierungsmustern darstellen. Jedoch war die verbleibende Menge an Zellmaterial (~15 μ g) nicht ausreichend, um diesen Ansatz zu etablieren. Erste Versuche zeigten, dass vor der PRM-Analyse eine Phosphopeptidanreicherung, z. B. über eine einstufige TiO_2 -Anreicherung, erfolgen muss. Ausgewählte Phosphopeptidsequenzen aus MAPK1 und

MAPK3 konnten zwar auch ohne Anreicherung mittels PRM identifiziert werden, wiesen aber zu wenige Fragmentationen sowie hohe Massenabweichungen (>5 ppm) für eine sichere Quantifizierung mittels der Software Skyline auf.

Eine Validierung der Phosphorylierung von MARCKS S170 nach IgM-Stimulation sowie nach Zugabe von Ibrutinib konnte mittels Western Blot erfolgen, da ein spezifischer Antikörper gegen pMARCKS S167/S170 verfügbar war. Die untersuchten CLL-Zellen wurden zunächst für 24 h auf CD40L (CD40 Ligand) exprimierenden Zellen kokultiviert, um die Expression von MARCKS zu induzieren, da der IgVH-Mutationsstatus der untersuchten Patienten nicht bekannt war und so ein vergleichbares Grundlevel von MARCKS induziert werden konnte. Die Veränderung der Phosphorylierung ist exemplarisch für einen der untersuchten Patienten gezeigt (siehe Abbildung 5-3).

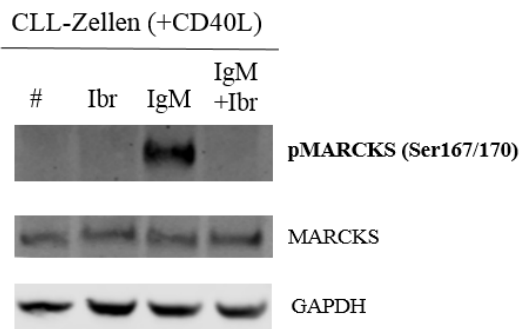


Abbildung 5-3: Validierung der Regulation von pMARCKS S170 mittels Western Blot. Nachdem die CLL-Zellen zunächst 24 h mit CD40L exprimierenden Zellen kokultiviert wurden, erfolgte die Zugabe von 1 μ M Ibrutinib für 60 min sowie eine Stimulation mit anti-IgM für 30 min (CECAD Köln, durchgeführt von Dr. Valeska Berg). MARCKS und GAPDH Proteinlevel sind in den untersuchten Zuständen vergleichbar. # = unbehandelte Zellen.

Die vorläufigen Ergebnisse der Western Blots stimmten mit den iTRAQ-Daten überein: Nach IgM-Stimulation lag eine deutlich erhöhte Phosphorylierung an S170 vor, während nach Zugabe von Ibrutinib trotz IgM-Stimulation die Phosphorylierung nicht induziert wurde. Die bisher untersuchten CLL-Patienten sprachen jedoch heterogen auf die Induktion von MARCKS durch CD40L an, sodass diese Beobachtungen noch an einem größeren Patientenkollektiv und unter Berücksichtigung des IgVH-Mutationsstatus, ohne CD40L Kokultivierung, reproduziert werden müssen.

5.3.2. Vorhersage einer möglichen biologischen Relevanz der Veränderungen

Kinasen steuern die intrazelluläre Signalweiterleitung und spielen so bei der Ausprägung von Veränderungen in Zellen eine essentielle Rolle. Um eine Vorhersage zu treffen, welche Kinasen für die vorliegenden Regulationen nach Zugabe von Ibrutinib in den CLL-Zellen verantwortlich sein könnten, wurde die onlinebasierte Software NetworKIN 3.0 verwendet. Diese Software überprüft anhand bekannter und vorhergesagter Konsensussequenzen von Kinasen Peptidsequenzen auf

Übereinstimmungen. Aus 233 Phosphorylierungsstellen, die ein signifikant verändertes Muster nach Zugabe von Ibrutinib im Vergleich zu nativen und anti-IgM stimulierten Zellen aufwiesen, konnten so 113 Phosphorylierungsstellen möglichen Kinasen zugeordnet werden (Auswahl siehe Tabelle 5-3 sowie für eine Gesamtübersicht siehe Tabelle 12-8).

Tabelle 5-3: Konsensussequenz-basierte Vorhersage von Kinasen, deren Substrate nach Ibrutinibzugabe differentiell vorlagen. Dargestellt ist eine Auswahl an Kinasefamilien, von denen mehr als 6 Substrate differentiell vorlagen. Die Daten basieren auf NetworKIN (Score ≥ 2). CDK = Cyclin-abhängige Kinase; CK = Kreatinkinase; CLK = *Dual specificity protein kinase*; CRK = Adaptermolekül; MAPK = Mitogen-aktivierte Proteinkinase; PK = Proteinkinase

Accession	Gename	pSite	pot. Kinase	Accession	Gename	pSite	pot. Kinase
P05455	SSB	S92	CDK1	Q7L7X3	TAOK1	S445	MAP2K3
P11171	EPB41	S85	CDK1	Q9Y463	DYRK1B	Y273	MAP2K3
P16949	STMN1	S25	CDK1	Q13541	EIF4EBP1	T70	MAPK1
P16949	STMN1	S38	CDK1	Q6JBY9	RCSD1	S108	MAPK13
Q6VY07	PACS1	T504	CDK1	Q6JBY9	RCSD1	S216	MAPK13
Q9BZB8	CPEB1	S208	CDK1	Q13541	EIF4EBP1	S65	MAPK13
Q9Y6A5	TACC3	S317	CDK1	Q6JBY9	RCSD1	S120	MAPK13
P16949	STMN1	S25	CDK1	Q6JBY9	RCSD1	S127	MAPK13
O00716	E2F3	S166	CDK2	O43521	BCL2L11	S77	MAPK9
P62191	PSMC1	T434	CDK2	P06239	LCK	T499	MAPK9
Q09472	EP300	T1906	CDK2	P16949	STMN1	S63	PAK1
Q09472	EP300	T1909	CDK2	Q13153	PAK1	S139	PAK1
P07900	HSP90AA1	S231	CDK4	P16949	STMN1	S16	PAK1
O43491	EPB41L2	S715	CDK5	Q04637	EIF4G1	S1209	PAK2
P07910	HNRNPC	S241	CK1	Q13177	PAK2	S20	PAK2
P08670	VIM	S412	CK1	Q13177	PAK2	S55	PAK2
P13807	GYS1	S652	CK1	Q13233	MAP3K1	S10	PAK2
Q9NRL3	STRN4	S276	CK1	P46100	ATRX	S706	PAK3
P11387	TOP1	S111	CK2	P13224	GP1BB	S191	PKA
O75822	EIF3J	S127	CK2	P52565	ARHGDI A	S34	PKA
P16949	STMN1	S46	CK2	P08238	HSP90AB1	S226	PKB
P23588	EIF4B	S498	CK2	P78527	PRKDC	S893	PKB
Q14005	IL16	S776	CK2	Q92945	KHSRP	S193	PKB
Q14978	NOLC1	S643	CK2	Q09666	AHNAK	S5780	PKB
Q13547	HDAC1	S421	CK2	Q09666	AHNAK	S5782	PKB
Q13547	HDAC1	S423	CK2	P29966	MARCKS	S170	PKC
P13807	GYS1	S657	CK2	O43290	SART1	S348	PKC
P18583	SON	S2238	CLK1	O43598	DNPH1	S123	PKC
Q13427	PPIG	S397	CLK1	O95466	FMNL1	S1059	PKC
Q13427	PPIG	S442	CLK1	P04233	CD74	S8	PKC
Q9NYF8	BCLAF1	S183	CLK1	P33241	LSP1	S204	PKC
Q9NYF8	BCLAF1	S564	CLK1	P52566	ARHGDIB	S44	PKC
Q13247	SRSF6	S291	CLK1	P62906	RPL10A	S50	PKC
Q13247	SRSF6	S293	CLK1	P78325	ADAM8	S683	PKC
Q8N2M8	CLASRP	S294	CLK4	Q13428	TCOF1	S849	PKC
Q8TF01	PNISR	S726	CLK4	Q14151	SAFB2	S613	PKC
P43405	SYK	Y364	CRK	Q6DN90	IQSEC1	S89	PKC
P46940	IQGAP1	Y172	CRK	Q6ZUJ8	PIK3AP1	S656	PKC
P51149	RAB7A	Y183	CRK	Q86YV0	RASAL3	S859	PKC
P61978	HNRNPK	Y380	CRK	Q8IX12	CCAR1	S908	PKC
Q13422	IKZF1	Y435	CRK	Q99623	PHB2	S286	PKC
Q9UJU6	DBNL	Y162	CRK	Q9UIQ6	LNPEP	S91	PKC
				Q9Y4G8	RAPGEF2	S960	PKC

Bei 18 Phosphorylierungsstellen wurde Proteinkinase C (PKC) als verantwortliche Kinase identifiziert, darunter ist auch S77 in MARCKS. Es ist bekannt, dass PKC- β ein *downstream* Zielprotein von BTK im BCR-Signalweg darstellt. Zudem wird diskutiert, ob eine Inhibierung von PKC die Aktivierung von NF- κ B verhindern und somit die Überlebenssignale der entarteten Zellen beeinträchtigen und eine Apoptose induzieren kann [165-166].

Die Rolle von MARCKS in der CLL ist noch unzureichend untersucht. In der Literatur wird MARCKS in Lungenkrebszellen eine mögliche Funktion im PI3K/AKT-Signalweg zugeordnet, der für die Beweglichkeit und Proliferation der Zellen entscheidend ist. Die Phosphorylierung von MARCKS scheint die Umwandlung von PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) zu PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat) durch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) zu beeinflussen, welches für die Aktivierung von AKT essentiell ist [167].

In den iTRAQ-Daten war nach Zugabe von Ibrutinib in *downstream* von BTK gelegenen Proteinen im BCR-Signalweg eindeutig eine Verringerung der Phosphorylierung nachweisbar. Diese Veränderung war in der Gruppe mit uIgVH-Genstatus besonders ausgeprägt (siehe Abbildung 4-18). Dies könnte auch klinisch relevant sein, da diese Beobachtung mit einer klinischen Studie übereinstimmt, in der Patienten mit uIgVH-Genstatus zunächst besser auf eine Therapie mit Ibrutinib ansprachen als die mit mIgVH-Status, während die Überlebensrate beider Patientengruppe abschließend vergleichbar war [65]. Weitere Untersuchungen hierzu stehen jedoch noch aus.

In beiden Patientengruppen wurde eine signifikant verringerte Phosphorylierung an S77 von BCL2L11 nach Ibr-Zugabe quantifiziert, die von MAPK9 reguliert zu werden scheint. Es ist bereits bekannt, dass BCL2L11, besser bekannt als Bim, eine wichtige Rolle in der Regulation der Apoptose von CLL-Zellen spielt. Es konnte gezeigt werden, dass eine anti-IgM induzierte Phosphorylierung von Bim an S69 über MAPK1/3 zu überlebensfördernden Signalen führt, wohingegen eine Dephosphorylierung proapoptotisch wirkt [168]. In der gleichen Studie wird zudem darauf hingewiesen, dass auch S77 und S104 eine Rolle in der Regulation von Apoptose und Proliferation spielen könnten, die noch nicht näher untersucht wurde, sodass die Dephosphorylierung von Bim eine wichtige Rolle in der Wirkweise von Ibrutinib spielen könnte.

Im Hinblick auf die unterschiedlichen Krankheitsverläufe der CLL-Patienten sind auch die Phosphorylierungsmuster nach IgM-Stimulation interessant, da auf diese Weise der Zustand der Zellen im menschlichen Körper nachgeahmt werden sollte. Durch diese Stimulation werden proliferations- und überlebensfördernde Signalwege induziert. Die iTRAQ-Daten zeigten, dass anti-IgM zu einer stärkeren Reaktion in Zellen mit uIgVH-Genstatus führte als in denen mit mIgVH-Genstatus (siehe Abbildung 4-17). Diese Ergebnisse stimmen mit Studien überein, die eine verstärkte BCR-Signalweiterleitung sowie eine erhöhte Abhängigkeit von diesem Signalweg in Patienten mit uIgVH-Genstatus postulieren [65, 68].

Die iTRAQ-Daten zeigten zudem, dass in Patienten mit uIgVH-Genstatus die Phosphorylierung an Tyrosinen der zentralen Proteine des BCR-Signalwegs, wie SYK und LYN, nach IgM-Stimulation verringert ist, jedoch nicht in der mIgVH-Gruppe. Dies deutet auf eine unterschiedliche Regulation der beteiligten Tyrosinkinase in den Patientengruppen hin, die gegensätzlich zu der allgemeinen Aktivierung und einer Erhöhung der Phosphorylierung verläuft.

Weitere Untersuchungen ausgewählter Phosphorylierungsstellen u.a. von LYN, SYK, BCL2L11 und MARCKS in frischen Blutproben mittels *targeted* MS/MS Verfahren sind bereits am ISAS geplant, um diese und weitere vorläufige Ergebnisse zu validieren.

5.4. Etablierung eines LC-MS basierten pHis-Nachweises

Die größte Herausforderung für den Nachweis einer N-Phosphorylierung wie Phosphohistidin liegt in der Instabilität der Phosphoamidatbindung unter sauren Bedingungen, die ihren Nachweis mit traditionellen RP-LC-MS Verfahren einschränkt.

Um eine möglichst schonende Probenaufarbeitung zu ermöglichen, wurden in dieser Arbeit zunächst Antikörper-basierte Verfahren zum Nachweis von pHis angewendet. Obwohl der verwendete pHis spezifische Antikörper (siehe Kapitel 3.2.9) eine hohe Spezifität in Western Blots zeigte (siehe Kapitel 4.4.1), konnte aus verschiedenen getesteten Bedingungen keine Anreicherung in Lösung auf Proteinebene erreicht werden. Die Ergebnisse der Immunpräzipitationen deuten darauf hin, dass die Affinität des anti-pHis Antikörpers nicht ausreicht, um dauerhaft an pHis zu binden und somit keine Extraktion des Phosphoprotein-Antikörper-Komplexes möglich war.

Erst kürzlich wurde die Herstellung eines weiterentwickelten, polyklonalen Antikörpers basierend auf dem pHis-Analogon pPye publiziert, der in ersten ELISA und Western Blot Analysen eine höhere Affinität und Spezifität zu pHis, dank geringerer Kreuzreaktivität zu pTyr, aufweist als vorhergehende anti-pHis Antikörper [124]. Die Spezifität dieses Antikörpers muss noch anhand biologischer Proben validiert werden. Zudem scheint die Entwicklung von monoklonalen 1-pHis und 3-pHis spezifischen Antikörpern einen Durchbruch in der Analyse von pHis in komplexen Proben darzustellen [37]. In einer ersten Studie an HEK293-Zellen konnte eine sehr geringe Kreuzreaktivität der Antikörper gegenüber einer Phosphorylierung an Ser, Thr bzw. Tyr und eine hohe Sensitivität sowie eine hohe Spezifität für die Isomere von pHis nachgewiesen werden.

Um eine Eignung von LC-MS basierten Ansätzen für den Nachweis von Phosphohistidin zu überprüfen, wurde zunächst ein Stabilitätstest mit verschiedenen, synthetischen pHis-Peptiden in 0,1 % TFA (v/v) bei pH ~2 durchgeführt, da dies dem niedrigsten pH-Wert entsprach, der während der Probenaufarbeitung sowie der chromatographischen Messung eingesetzt wurde (siehe Kapitel 4.4.2.1). Im Gegensatz zu einer Halbwertszeit von wenigen Sekunden, die von Hultquist *et al.* [24] in 1 M HCl

bei 49 °C nachgewiesen wurde, betrug die Halbwertszeit in 0,1 % TFA bei RT etwa 150 min sowie bei 60 °C etwa 13 min, mit Standardabweichungen von maximal 15 %. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass sowohl eine chromatographische Auftrennung sowie eine Festphasenextraktion bei gemäßigten Temperaturen unter sauren Bedingungen in einem eingeschränkten Zeitraum möglich sind. Bei der Wahl des chromatographischen Systems wurde deutlich, dass in schwach sauren und neutralen Puffersystemen die Sensitivität des Nachweises stark von der Peptidsequenz abhing. Während mit einem 0,1 % Essigsäure-Puffersystem, pH ~3,3, die geringste Dephosphorylierung von pHis-Peptiden stattfand, war im saureren Standardsystem mit 0,1 % TFA/FA bei pH \leq 2,8 zwar ein größerer Verlust der Phosphorylierung, aber auch schärfere Signale ohne Tailing und eine insgesamt hohe Sensitivität für alle untersuchten pHis-BSA Peptide im Chromatogramm nachweisbar (siehe Abbildung 4-22). Wichtig bei der Verwendung des TFA/FA-Systems war, dass die Temperatur des Säulenofens von 60 °C auf 35 °C herabgesetzt und eine schnelle chromatographische Trennung in 0,1 % FA über einen kurzen Gradienten von nicht mehr als 60 min sowie ein kurzes Aufspülen der Proben auf die Vorsäule von 5 min in 0,1 % TFA eingesetzt wurden. Zur weiteren Verringerung der auftretenden Dephosphorylierung könnte ein Aufspülen der Probe in 0,1 % TFA, für eine maximale Bindung der Analyten an die C18-Phase, mit anschließender Trennung in 0,1 % Essigsäure getestet werden.

Bei der Datenbanksuche von *in vitro* phosphoryliertem BSA fiel neben den geringen *Mascot Ion Score* für einige Phospho-PSM (Score <20) vor allem die falsche bzw. unsichere Zuweisung der Phosphorylierung zu Histidin, trotz Verwendung des Algorithmus phosphoRS, auf. Da in phosphoRS keine Anpassung der Suchparameter möglich war, wurde der in PD implementierte Algorithmus ptmRS herangezogen, um die für pHis charakteristischen Neutralverluste von 80 Da und 98 Da vom Vorläuferion sowie das Phosphohistidin-Immoniumion für die Lokalisierung dieser PTM einzubinden (siehe Kapitel 4.4.2.3).

Ein ähnlicher Ansatz wurde auch von Oslund *et al.* [30] eingesetzt, die ein charakteristisches Triplet aus Neutralverlusten, 80, 98 und 116 Da, nach CID-Fragmentierung zur spezifischen Identifizierung von pHis nutzen. In dieser Publikation wurde ebenfalls der starke Verlust von 98 Da vom Vorläuferion diskutiert, der zunächst untypisch für pHis-Peptide erscheint. Anhand von ¹⁸O markierten Peptiden, die am C-Terminus oder an Asparaginsäure (Asp) bzw. Glutaminsäure (Glu) markiert waren, konnte der Mechanismus geklärt werden. Bei der Abspaltung handelt es sich um ein Acylphosphat, welches in einer Gasphasenreaktion gebildet wird. Es wurde festgestellt, dass sowohl der C-Terminus als auch, falls vorhanden, das α -Carboxylat der Seitenketten von Asp bzw. Glu mit der Phosphatgruppe an His reagieren und Wasser abgeben kann, sodass insgesamt ein Verlust von Phosphorsäure (98 Da) auftritt. Die bei HCD-Fragmentierung auftretenden Neutralverluste von 80 und 98 Da des pHis Vorläuferions waren deutlich weniger dominant (siehe Abbildung 4-23), sodass die generierten Spektren eine bessere

Abdeckung der b- und y-Fragmentionsreihe und somit eine verlässlichere Identifizierung der modifizierten Peptide sowie eine verbesserte Lokalisation der Phosphorylierung ermöglichen.

5.4.1. Validierung des indirekten SCX-Nachweisverfahrens

Kationenaustauscher wurden in der Arbeit zunächst für die Aufreinigung der *in vitro* phosphorylierten pHis-Peptide eingesetzt, da nach Inkubation mit Kaliumphosphoramidat durchschnittlich weniger als 50 % der Peptide zu der phosphorylierten Variante umgesetzt wurden. Aufgrund der erfolgreichen Trennung der Peptidvarianten anhand ihrer unterschiedlichen Ladungszustände mittels SCX und der relativ hohen Stabilität der pHis-Peptide im SCX-Puffer bei pH 2,7, wurde ein zweistufiges Verfahren für den indirekten Nachweis von pHis entwickelt (siehe Kapitel 4.4.3.2). Mittels dieser Strategie konnten 35 Peptidsequenzen ermittelt werden, die in beiden Replikaten einen für pHis charakteristischen Shift in den SCX-Auftrennungen zeigten und nicht in den Negativkontrollen nachweisbar waren (siehe Anhang Tabelle 12-7).

Trotz der hohen Reinheit der 2+ Fraktion von über 99 % und der Validierung der Ergebnisse durch den Abgleich der identifizierten Peptide in den Negativkontrollen, konnte nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Sequenzen durch eine unzureichende Ladungstrennung in der ersten SCX-Auftrennung nach erneuter Trennung in den Fraktionen $\geq 2+$ (Ü-II) detektierbar und somit falsch positiv waren. Daher wurden für eine weitere Validierung des Verfahrens 32 stabil-Isotopen markierte, sogenannte „schwere“ (H) Peptide aus *E. coli* synthetisiert, die ein Histidin enthielten und teilweise als pHis Sequenzen mittels SCX identifiziert wurden (Sequenzen siehe Anhang Tabelle 12-9). Diese Peptide besaßen einen Massenshift von 8 Da (Lys) bzw. 10 Da (Arg) zu den endogenen „leichten“ (L) Peptiden, jedoch vergleichbare Retentionszeiten. Als *Proof-of-Principle* Experiment wurden je 50 pmol der schweren Peptide in einen 200 µg *E. coli* Verdau hinzugefügt, sodass die „schweren“ Peptide im Überschuss vorlagen. Ziel war es, das Verhältnis von „schweren“ und „leichten“ Peptidvarianten anhand ihrer Abundanzen in den geschichteten Fraktionen zu bestimmen, um wie in Abbildung 5-4 dargestellt, aufgrund eines Verhältnisses von H/L >1 falsch positive Treffer nachweisen zu können.

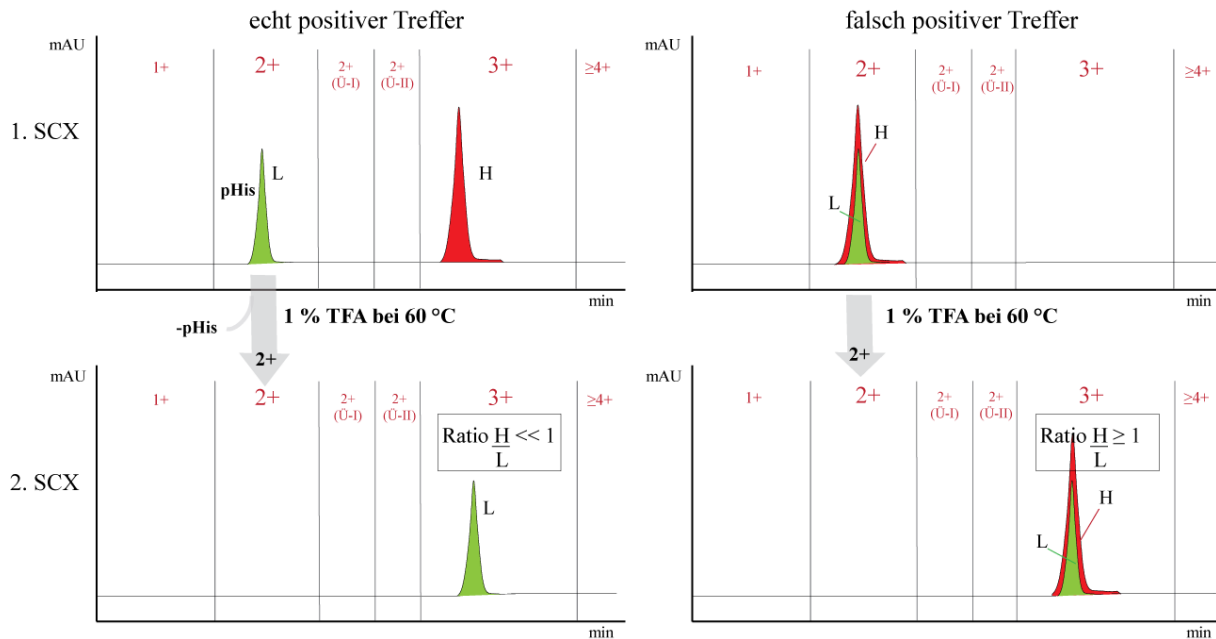


Abbildung 5-4: Schematische Darstellung der Validierung des indirekten SCX-Verfahrens. Mittels „schwerer“ Peptide sollte sichergestellt werden, dass Histidin-haltige Peptide ohne Phosphorylierung nicht in der Fraktion 1+/2+ der ersten SCX-Auftrennung eluieren und somit unspezifisch in dem etablierten SCX-Protokoll angereichert werden. Zur Bestimmung des Verhältnisses von „schweren“ zu „leichten“ Peptiden, wurden nach der zweiten SCX-Trennung LC-MS Analysen durchgeführt und die Peakflächen mittels der Software Skyline bestimmt. Verhältnisse H/L >1 deuten auf eine falsch positive Identifizierung hin.

In der LC-MS Analyse der Fraktionen 2+(Ü-II) sowie 3+ nach der zweiten SCX-Auftrennung waren die Abundanzen der „leichten“ und „schweren“ Peptide jedoch so gering, dass keine Quantifizierung anhand der Peptidflächen (XICs) erfolgen konnte. Das Vorliegen der „schweren“ Peptide unterhalb des Quantifizierungslimits deutet auf eine hohe Spezifität des indirekten SCX-basierten Nachweises hin. Allerdings konnten bei einer separaten SCX-Auftrennung von 50 pmol pro Peptid ohne komplexen Hintergrund 3 der 32 „schweren“ Peptide mit 1-3 PSM pro Peptid in Fraktion 2+ nachgewiesen werden (Doppelbestimmung), sodass falsch positive Identifikationen nicht vollständig ausgeschlossen werden können.

Das etablierte SCX-Verfahren stellt dennoch, vor allem unter Verwendung von geeigneten Negativkontrollen, ein vielversprechendes und sensitives Protokoll für den indirekten Nachweis von pHis in komplexen Proben dar.

5.4.2. Herausforderungen der pHis-Identifizierung in *E. coli*

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde an einem direkten Nachweisverfahren gearbeitet, welches eine Anreicherung von pHis aus komplexen Proben ermöglicht. Der Nachweis von endogenen pHis mittels ERLIC-Fraktionierung und anschließender RP-LC-MS Messung stellt das erste bekannte chromatographische Verfahren zur Anreicherung von intakten pHis aus prokaryotischen Zellen dar.

Insgesamt konnten 25 Phosphopeptidsequenzen mit 22 unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, in denen eine eindeutige Lokalisation der Phosphorylierung an Histidin vorlag (siehe Kapitel 4.4.4.2). So konnten sechs pHis Komponenten des PEP-PTS Systems nachgewiesen werden: ppsA, ptsP, nagE, mtlA, ptsI und ptsN. Diese identifizierten Phosphorylierungsstellen gehören zu den 63 bekannten pHis-Stellen, die in der Datenbank UniProt für *E. coli* gelistet sind. Der Vergleich mit der bisher umfassendsten Antikörper-basierten pHis Studie in *E. coli* von Oslund *et al.* [30] zeigt die hohe Sensitivität des etablierten ERLIC-Verfahrens. In der publizierten Studie wurden aus 5 mg *E. coli*-Lysat mittels Immunpräzipitation und anschließender LC-MS Analyse 15 Phosphorylierungsstellen, darunter 10 Proteine des PTS Systems, aber keine Histidinkinase nachgewiesen. Es wird angenommen, dass PTS Proteine mit 1000-2000 Kopien pro Zelle vorliegen, wohingegen von phosphorylierten Histidinkinasen vermutlich nur wenige Kopien zu einem bestimmten Zeitpunkt existieren [30]. Eine Besonderheit stellte daher der Nachweis des Peptids GIVEEGpHKIK aus arcB mit dem ERLIC-Protokoll dar, obwohl weniger als 20 % der Proteinmenge im Vergleich zur Antikörper-basierten Detektion eingesetzt wurde. Trotz des geringen *Mascot Ion Scores* von 14 konnten bei manueller Validierung der MS/MS Spektren die charakteristischen Neutralverluste von 80 und 98 Da nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5-5).

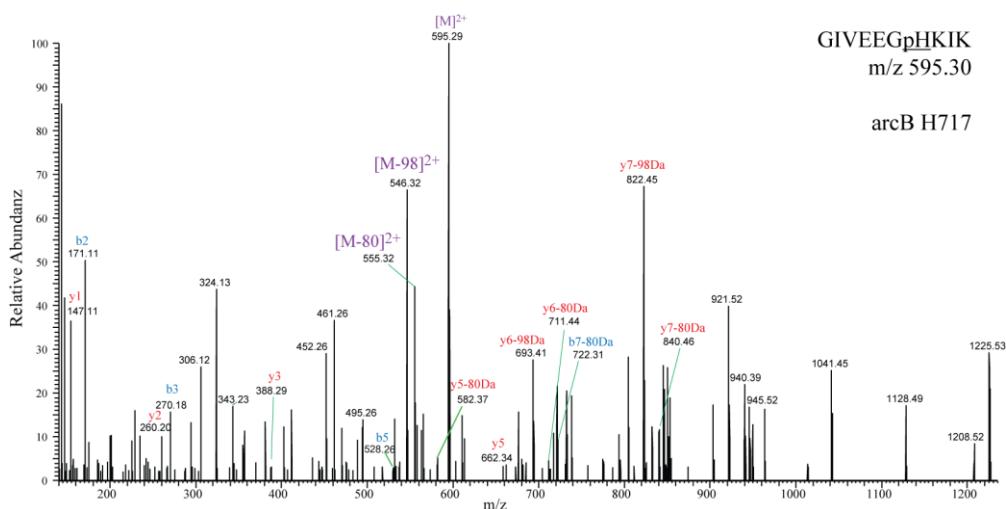


Abbildung 5-5: MS/MS Spektrum von GIVEEGpHKIK aus arcB. Das pHis Peptid konnte mit zwei PSM identifiziert werden. Die für pHis charakteristischen Neutralverluste von 80 und 98 Da waren nachweisbar, obwohl keine vollständige Fragmentierung des Vorläuferions vorlag.

Die identifizierte Phosphorylierungsstelle H717 von arcB stimmt zudem mit Literaturdaten überein, in denen anhand von Genmutations-Studien die Phosphorylierung von Histidin an Position 717 als wichtiger Bestandteil des Arc-Phosphorelay-Systems ermittelt wurde. ArcB stellt in diesem System die membrangebundene Sensorkinase dar, die zusammen mit ihrem *Response Regulator* arcA an der

Regulation des Sauerstoffstoffwechsels in *E. coli* beteiligt ist [169]. Das Phosphorelay-System ist in Abbildung 5-6 dargestellt.

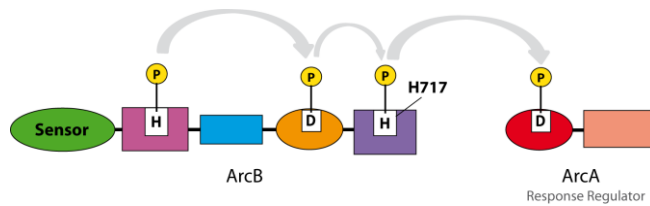


Abbildung 5-6: Schematische Darstellung des Arc Phosphorelay-Systems in Prokaryoten (modifiziert nach [170]). Die identifizierte Phosphoaminosäure H717 in ArcB wurde gekennzeichnet.

Interessanterweise wurde an fünf der 25 pHis-Peptide eine N-terminale Acetylierung mittels Datenbanksuche festgestellt, die bislang nicht beschrieben wurde. Hierunter war auch die mittels SCX und ERLIC-Fraktionierung identifizierte Phosphorylierung an H402 der PEP Carboxylase (siehe Kapitel 4.4.4.2). Eine manuelle Untersuchung der zugehörigen MS/MS Spektren zeigte, dass die acetylierten Phosphopeptide nach HCD-Fragmentierung einen Neutralverlust von 98 Da des Vorläuferions aufwiesen, während ein Verlust von Metaphosphorsäure (-80 Da) nicht sichtbar war. Zudem dominierte bei den b-Fragmentationen der Verlust von 98 Da (siehe Abbildung 5-7 A).

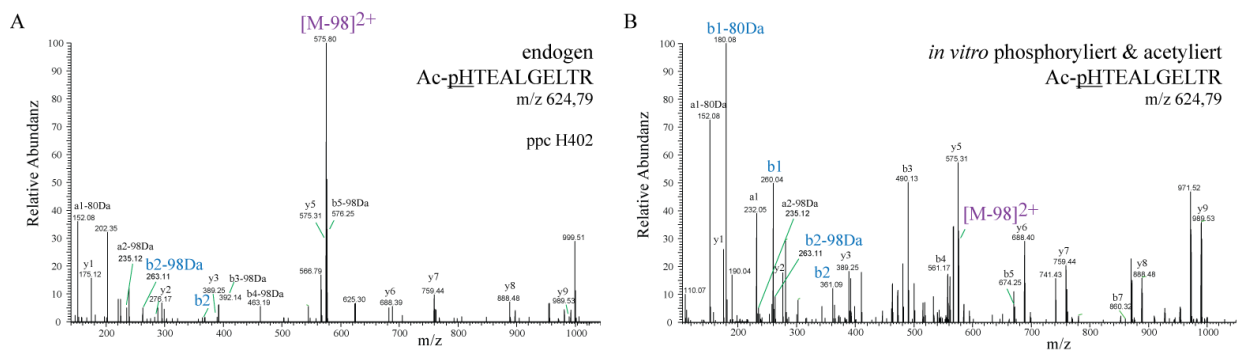


Abbildung 5-7: Vergleich von MS/MS Spektren mittels ERLIC angereicherter und synthetischer pHis-Peptide mit Acetylierung. (A) Spektrum des angereicherten, N-terminal acetylierten pHis Peptids HTEALGELTR aus ppc (m/z 624,785) sowie (B) der gleichen *in vitro* phosphorylierten und acetylierten Peptidsequenz.

Zur weiteren Untersuchung der Modifikation wurden die Peptide HILGLDHK und HTEALGELTR neu synthetisiert, *in vitro* phosphoryliert und anschließend acetyliert (20 mM Sulfo-NHS-Acetat für 2 h bei 37 °C). Die erhaltenen MS/MS Spektren wurden mit den aufgenommenen Spektren nach ERLIC-Fraktionierung verglichen (siehe Abbildung 5-7). Nach *in vitro* Acetylierung des pHis Peptids konnte das b1-Ion (260,04 Da) bzw. b1-80 Da-Ion (180,08 Da) im MS/MS Spektrum nachgewiesen werden, das charakteristisch für eine Acetylierung am N-Terminus ist, jedoch in den Spektren der endogenen Peptide nicht vorliegt [171]. Das Fehlen dieses Signals deutet daraufhin, dass die endogen identifizierte

Modifikation nicht am N-Terminus des Peptids liegt. Somit könnte sowohl eine Acetylierung des nicht phosphorylierten Stickstoffs des Imidazolrings von Histidin oder ein Acetylphosphat anstatt einer reinen Phosphorylierung der Histidinseitenkette vorliegen. Acetylphosphat wurde in *E. coli* bereits als Modifikation von Lysinen beschrieben [172]. Eine erneute Datenbanksuche mit der Modifikation „Acetylphosphat“ (139,99 Da) führte jedoch lediglich zu Identifikationen der Peptidsequenzen mit Massenabweichungen >10 ppm. Zudem sprach der auftretende Neutralverlust vom Vorläuferion von lediglich 98 Da gegen eine direkte Verknüpfung von Acetylierung und Phosphorylierung. Anhand der bisherigen Ergebnisse konnte ausgeschlossen werden, dass die Acetylierung am N-Terminus des Peptids liegt, eine genaue Lokalisation sowie eine mögliche Rolle in *E. coli* konnte anhand von Literaturvergleichen jedoch nicht gefunden werden. Es ist nicht auszuschließen, dass die Acetylierung artifiziell, z. B. durch Inkubation in den ERLIC Puffern, hervorgerufen wurde, sodass zunächst die Reproduzierbarkeit dieser Identifikation überprüft werden sollte.

Eine weitere Optimierung des ERLIC-Verfahrens ist im Hinblick auf die geringe chromatographische Auflösung der anschließenden RP-LC Trennung notwendig. Da Komponenten des ERLIC-Puffers, insbesondere das viskose TEAP aus Puffer B, mittels Festphasenextraktion nicht zufriedenstellend aus den Proben entfernt werden konnten, traten Peakbreiten >0,2 min sowie sehr starke Signale von Kontaminationen (u.a. Polyethylenglycol: 44 Da Polymer) im TIC auf, die in späteren Fraktionen und somit im hinteren Teil des ERLIC-Gradienten zunahm. Allerdings zeigt eine aktuelle Studie zu ERLIC auf WAX Säulen, dass die in dieser Arbeit verwendete Kombination von stationärer und mobiler Phase die beste Trennung von phosphorylierten und nicht phosphorylierten sauren Peptiden sowie eine spezifische Anreicherung von Phosphopeptiden aus einem komplexen HeLa-Verdau ermöglicht, sodass es schwierig sein wird einen adäquaten Ersatz zu finden [118]. Eine mögliche Alternative stellt die Optimierung der Festphasenextraktion der ERLIC-Fraktionen unter Berücksichtigung der Säureinstabilität der P-N Bindung dar, in der z.B. weitere Waschstreps angeschlossn werden könnten.

Obwohl neuere Antikörper-basierte Verfahren eine hohe Sensitivität bei der Analyse von endogenen pHis in prokaryotischen Zellen aufzeigen [30, 123], ist die in dieser Arbeit entwickelte Methode nochmal deutlich sensitiver. Dennoch müssen noch weitere Optimierungsschritte erfolgen, um das ERLIC-basierte Verfahren auch auf komplexere eukaryotische Organismen übertragen zu können, in denen pSer und pThr etwa 98 % der Phosphorylierungen ausmachen [11]. Eine Möglichkeit wäre eine Abreicherung der O-Phosphorylierungen mittels spezifischer Serin/Threonin-Phosphatasen. Jedoch konnte bereits bei einigen „spezifischen“ Proteinphosphatasen, wie den Proteinphosphatasen 1, 2A und 2C, eine Histidin-Phosphatase-Aktivität nachgewiesen werden [173], sodass zunächst eine erneute Evaluierung der Spezifität der Phosphatasen stattfinden muss.

6. Zusammenfassung

Ausgehend von der Analyse synthetischer Peptide und Standardproteine konnten in der vorliegenden Arbeit LC-MS basierte Strategien etabliert werden, die Einblicke in die Signalweitergabe in entarteten Immunzellen und prokaryotischen Zellen ermöglichten.

Es wurde gezeigt, dass mit einem sensitiven und robusten Protokoll für den Verdau und die Anreicherung von phosphorylierten Sequenzen grundsätzlich eine quantitative Proteomanalyse von klinisch relevanten Patientenproben möglich ist. Die Quantifizierung von mehr als 10.000 Phosphopeptidsequenzen, sowie 3466 Proteinen auf globaler Ebene, stellt die bislang umfassendste Studie des Proteoms von CLL-Zellen dar. Obwohl die Phosphorylierungsmuster der Patienten sehr heterogen waren, ermöglichte eine konservative statistische Datenauswertung das Auffinden signifikanter Veränderungen nach Stimulation sowie Inhibierung des BCR Signalwegs. MARCKS wurde hierbei als eine mögliche Schlüsselkomponente für die Progression der CLL ermittelt.

Somit zeigt sich bereits in dieser *Proof-of-Principle* Arbeit, dass die quantitative Proteom- und Phosphoproteomforschung ein enormes Potential für die sogenannte „personalisierte Medizin“ birgt.

Die größte Herausforderung für die Analyse von Phosphohistidin, insbesondere in komplexen Proben, stellt die Säureinstabilität der PTM dar, die zunächst im Hinblick auf die Anforderungen einer RP-LC-MS basierten Analyse charakterisiert wurde.

Abschließend konnten zwei Chromatographie-basierte Anreicherungsverfahren für endogene pHis entwickelt werden. Ausgehend von Publikationen zur Anreicherung von O-Phosphorylierungen mittels ERLIC, führte eine Anpassung dieses Protokolls zur Identifizierung von 25 intakten pHis Peptiden aus lediglich 800 µg *E. coli*-Verdau, von denen acht Phosphorylierungsstellen über die UniProt Datenbank validiert wurden. Hierbei stachen, neben Komponenten des PEP-PTS Systems, die prokaryotische Histidinkinase *arcB* und eine bisher unbekannte Phosphorylierungsstelle der PEP Carboxylase *ppc*, die eng mit dem PTS vernetzt ist, hervor. Obwohl neuere Antikörper-basierte Verfahren ebenfalls eine hohe Sensitivität bei der Analyse von pHis aufzeigen, benötigt das etablierte Protokoll eine fünffach geringere Proteinmenge bei vergleichbarer Sensitivität. Dennoch sind zukünftig weitere Verbesserungen des ERLIC basierten Verfahrens nötig, um eine standardisierte und effiziente pHis-Analyse, auch von eukaryotischen Proben, zu ermöglichen.

7. Summary

The analysis of synthetic peptides and standard proteins was the starting point to establish LC-MS based strategies to gain insights into the transduction of degenerated immune cells and prokaryotic cells.

It was demonstrated that quantitative phosphoproteomics can be used to analyze clinical samples if a sensitive and robust protocol for the digestion and enrichment of phosphopeptides is established. This approach led to the quantification of more than 10,000 phosphopeptides as well as 3466 proteins in the global analysis and therefore represents the most comprehensive study on the proteome of CLL cells so far. Although the phosphorylation pattern of CLL patients was heterogeneous, a conservative statistical data evaluation strategy enabled the identification of significant changes after stimulation and inhibition of the BCR signaling pathway. MARCKS was detected as a potential key player in the progression of CLL.

Overall this proof-of-principle study has proven that quantitative proteomics and phosphoproteomics have enormous potential to be part of personalized medicine in the future.

The biggest challenge for the analysis of phosphohistidine, especially in complex samples, is its instability in acids, which was characterized regarding the demands of RP-LC-MS analyses. Two chromatography based enrichment techniques were established for the detection of endogenous pHis. An adaption of an ERLIC protocol for the enrichment of O-phosphorylated peptides enabled the detection of intact 25 pHis peptides in *E. coli* from only 800 μg , of which eight sites were validated by entries in the UniProt database. Obviously prominent were, apart from components of the PEP-PTS system, the prokaryotic histidine kinase *arcB* as well as the unknown pHis site of the PEP carboxylase *ppc*, which is related to the PTS. Although, recent antibody based strategies provide a high sensitivity for the analysis of pHis, the established protocol enables a comparable sensitivity with lower starting amounts. Nevertheless, further improvements of the ERLIC strategy are needed to standardize and increase the efficiency of the pHis analysis, most notably for the analysis of eukaryotic samples.

8. Literaturverzeichnis

1. Wasinger, V. C.; Cordwell, S. J.; Cerpa-Poljak, A.; Yan, J. X.; Gooley, A. A.; Wilkins, M. R.; Duncan, M. W.; Harris, R.; Williams, K. L.; Humphery-Smith, I., Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* **1995**, *16* (7), 1090-4.
2. Wilkins, M. R.; Pasquali, C.; Appel, R. D.; Ou, K.; Golaz, O.; Sanchez, J. C.; Yan, J. X.; Gooley, A. A.; Hughes, G.; Humphery-Smith, I.; Williams, K. L.; Hochstrasser, D. F., From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio/technology (Nature Publishing Company)* **1996**, *14* (1), 61-5.
3. Burkhardt, J. M.; Vaudel, M.; Gambaryan, S.; Radau, S.; Walter, U.; Martens, L.; Geiger, J.; Sickmann, A.; Zahedi, R. P., The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood* **2012**, *120* (15), e73-82.
4. Nagaraj, N.; Wisniewski, J. R.; Geiger, T.; Cox, J.; Kircher, M.; Kelso, J.; Paabo, S.; Mann, M., Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Molecular systems biology* **2011**, *7*, 548.
5. Beck, F.; Geiger, J.; Gambaryan, S.; Veit, J.; Vaudel, M.; Nollau, P.; Kohlbacher, O.; Martens, L.; Walter, U.; Sickmann, A.; Zahedi, R. P., Time-resolved characterization of cAMP/PKA-dependent signaling reveals that platelet inhibition is a concerted process involving multiple signaling pathways. *Blood* **2014**, *123* (5), e1-e10.
6. Venne, A. S.; Kollipara, L.; Zahedi, R. P., The next level of complexity: crosstalk of posttranslational modifications. *Proteomics* **2014**, *14* (4-5), 513-24.
7. Lorocho, S.; Dickhut, C.; Zahedi, R. P.; Sickmann, A., Phosphoproteomics--more than meets the eye. *Electrophoresis* **2013**, *34* (11), 1483-92.
8. Pagel, O.; Lorocho, S.; Sickmann, A.; Zahedi, R. P., Current strategies and findings in clinically relevant post-translational modification-specific proteomics. *Expert review of proteomics* **2015**, *12* (3), 235-53.
9. Cohen, P., The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends in biochemical sciences* **2000**, *25* (12), 596-601.
10. Gijzen, M.; King, P.; Perera, T.; Parker, P. J.; Harris, A. L.; Larijani, B.; Kong, A., HER2 phosphorylation is maintained by a PKB negative feedback loop in response to anti-HER2 herceptin in breast cancer. *PLoS biology* **2010**, *8* (12), e1000563.
11. Olsen, J. V.; Blagoev, B.; Gnad, F.; Macek, B.; Kumar, C.; Mortensen, P.; Mann, M., Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **2006**, *127* (3), 635-48.
12. Hunter, T.; Sefton, B. M., Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1980**, *77* (3), 1311-5.
13. Hunter, T., A thousand and one protein kinases. *Cell* **1987**, *50* (6), 823-9.
14. Hunter, T.; Plowman, G. D., The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends in biochemical sciences* **1997**, *22* (1), 18-22.
15. Martensen, T. M., Chemical properties, isolation, and analysis of O-phosphates in proteins. *Methods in enzymology* **1971**, *107*, 1-23.
16. Kuhlberg, A.; Haid, M.; Metzger, S., Characterization of O-phosphohydroxyproline in rat {alpha}-crystallin A. *The Journal of biological chemistry* **2010**, *285* (41), 31484-90.
17. Urushizaki, Y.; Seifter, S., Phosphorylation of hydroxylysine residues in collagen synthesized by cultured aortic smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1985**, *82* (10), 3091-5.

18. Elsholz, A. K.; Turgay, K.; Michalik, S.; Hessling, B.; Gronau, K.; Oertel, D.; Mader, U.; Bernhardt, J.; Becher, D.; Hecker, M.; Gerth, U., Global impact of protein arginine phosphorylation on the physiology of *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, *109* (19), 7451-6.
19. Fuhrmann, J.; Schmidt, A.; Spiess, S.; Lehner, A.; Turgay, K.; Mechtler, K.; Charpentier, E.; Clausen, T., McsB is a protein arginine kinase that phosphorylates and inhibits the heat-shock regulator CtsR. *Science* **2009**, *324* (5932), 1323-7.
20. Boyer, P. D.; Deluca, M.; Ebner, K. E.; Hultquist, D. E.; Peter, J. B., Identification of phosphohistidine in digests from a probable intermediate of oxidative phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **1962**, *237*, PC3306-PC3308.
21. Wei, Y. F.; Matthews, H. R., Identification of phosphohistidine in proteins and purification of protein-histidine kinases. *Methods in enzymology* **1991**, *200*, 388-414.
22. Attwood, P. V.; Piggott, M. J.; Zu, X. L.; Besant, P. G., Focus on phosphohistidine. *Amino acids* **2007**, *32* (1), 145-56.
23. Sickmann, A.; Meyer, H. E., Phosphoamino acid analysis. *Proteomics* **2001**, *1* (2), 200-6.
24. Hultquist, D. E., The preparation and characterization of phosphorylated derivatives of histidine. *Biochimica et biophysica acta* **1968**, *153* (2), 329-40.
25. Grefen, C.; Harter, K., Plant two-component systems: principles, functions, complexity and cross talk. *Planta* **2004**, *219* (5), 733-42.
26. Stock, A. M.; Robinson, V. L.; Goudreau, P. N., Two-component signal transduction. *Annual review of biochemistry* **2000**, *69*, 183-215.
27. Deutscher, J.; Ake, F. M.; Derkaoui, M.; Zebre, A. C.; Cao, T. N.; Bouraoui, H.; Kentache, T.; Mokhtari, A.; Milohanic, E.; Joyet, P., The bacterial phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system: regulation by protein phosphorylation and phosphorylation-dependent protein-protein interactions. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **2014**, *78* (2), 231-56.
28. Escalante, A.; Salinas Cervantes, A.; Gosset, G.; Bolivar, F., Current knowledge of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system: peculiarities of regulation and impact on growth and product formation. *Applied microbiology and biotechnology* **2012**, *94* (6), 1483-94.
29. Meadow, N. D.; Fox, D. K.; Roseman, S., The bacterial phosphoenolpyruvate: glycolate phosphotransferase system. *Annual review of biochemistry* **1990**, *59*, 497-542.
30. Oslund, R. C.; Kee, J. M.; Couvillon, A. D.; Bhatia, V. N.; Perlman, D. H.; Muir, T. W., A phosphohistidine proteomics strategy based on elucidation of a unique gas-phase phosphopeptide fragmentation mechanism. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (37), 12899-911.
31. Matthews, H. R., Protein kinases and phosphatases that act on histidine, lysine, or arginine residues in eukaryotic proteins: a possible regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Pharmacology & therapeutics* **1995**, *67* (3), 323-50.
32. Lapek, J. D., Jr.; Tomblin, G.; Friedman, A. E., Mass spectrometry detection of histidine phosphorylation on NM23-H1. *Journal of proteome research* **2011**, *10* (2), 751-5.
33. Wagner, P. D.; Vu, N. D., Phosphorylation of ATP-citrate lyase by nucleoside diphosphate kinase. *The Journal of biological chemistry* **1995**, *270* (37), 21758-64.
34. Muimo, R.; Hornickova, Z.; Riemen, C. E.; Gerke, V.; Matthews, H.; Mehta, A., Histidine phosphorylation of annexin I in airway epithelia. *The Journal of biological chemistry* **2000**, *275* (47), 36632-6.
35. Srivastava, S.; Di, L.; Zhdanova, O.; Li, Z.; Vardhana, S.; Wan, Q.; Yan, Y.; Varma, R.; Backer, J.; Wulff, H.; Dustin, M. L.; Skolnik, E. Y., The class II phosphatidylinositol 3 kinase

C2beta is required for the activation of the K⁺ channel KCa3.1 and CD4 T-cells. *Molecular biology of the cell* **2009**, *20* (17), 3783-91.

36. Srivastava, S.; Zhdanova, O.; Di, L.; Li, Z.; Albaum, M.; Wulff, H.; Skolnik, E. Y., Protein histidine phosphatase 1 negatively regulates CD4 T cells by inhibiting the K⁺ channel KCa3.1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105* (38), 14442-6.

37. Fuhs, S. R.; Meisenhelder, J.; Aslanian, A.; Ma, L.; Zagorska, A.; Stankova, M.; Binnie, A.; Al-Obeidi, F.; Mauger, J.; Lemke, G.; Yates, J. R., 3rd; Hunter, T., Monoclonal 1- and 3-Phosphohistidine Antibodies: New Tools to Study Histidine Phosphorylation. *Cell* **2015**, *162* (1), 198-210.

38. Edman, P., A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Archives of biochemistry* **1949**, *22* (3), 475.

39. Patterson, S. D.; Aebersold, R. H., Proteomics: the first decade and beyond. *Nature genetics* **2003**, *33* Suppl, 311-23.

40. Mann, M.; Hojrup, P.; Roepstorff, P., Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biological mass spectrometry* **1993**, *22* (6), 338-45.

41. Pappin, D. J.; Hojrup, P.; Bleasby, A. J., Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Current biology : CB* **1993**, *3* (6), 327-32.

42. Hillenkamp, F.; Karas, M., Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods in enzymology* **1990**, *193*, 280-95.

43. McCormack, A. L.; Schieltz, D. M.; Goode, B.; Yang, S.; Barnes, G.; Drubin, D.; Yates, J. R., 3rd, Direct analysis and identification of proteins in mixtures by LC/MS/MS and database searching at the low-femtomole level. *Analytical chemistry* **1997**, *69* (4), 767-76.

44. Eng, J. K.; McCormack, A. L.; Yates, J. R., An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1994**, *5* (11), 976-89.

45. Perkins, D. N.; Pappin, D. J.; Creasy, D. M.; Cottrell, J. S., Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **1999**, *20* (18), 3551-67.

46. Burkhart, J. M.; Schumbrutzki, C.; Wortelkamp, S.; Sickmann, A.; Zahedi, R. P., Systematic and quantitative comparison of digest efficiency and specificity reveals the impact of trypsin quality on MS-based proteomics. *Journal of proteomics* **2012**, *75* (4), 1454-62.

47. Olsen, J. V.; Ong, S. E.; Mann, M., Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2004**, *3* (6), 608-14.

48. Cheng, H. C.; Kemp, B. E.; Pearson, R. B.; Smith, A. J.; Misconi, L.; Van Patten, S. M.; Walsh, D. A., A potent synthetic peptide inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **1986**, *261* (3), 989-92.

49. Schlosser, A.; Pipkorn, R.; Bossemeyer, D.; Lehmann, W. D., Analysis of protein phosphorylation by a combination of elastase digestion and neutral loss tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry* **2001**, *73* (2), 170-6.

50. Taouatas, N.; Heck, A. J.; Mohammed, S., Evaluation of metalloendopeptidase Lys-N protease performance under different sample handling conditions. *Journal of proteome research* **2010**, *9* (8), 4282-8.

51. Beausoleil, S. A.; Villen, J.; Gerber, S. A.; Rush, J.; Gygi, S. P., A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization. *Nature biotechnology* **2006**, *24* (10), 1285-92.

52. Taus, T.; Kocher, T.; Pichler, P.; Paschke, C.; Schmidt, A.; Henrich, C.; Mechtler, K., Universal and confident phosphorylation site localization using phosphoRS. *Journal of proteome research* **2011**, *10* (12), 5354-62.
53. Kim, M. S.; Pinto, S. M.; Getnet, D.; Nirujogi, R. S.; Manda, S. S.; Chaerkady, R.; Madugundu, A. K.; Kelkar, D. S.; Isserlin, R.; Jain, S.; Thomas, J. K.; Muthusamy, B.; Leal-Rojas, P.; Kumar, P.; Sahasrabudhe, N. A.; Balakrishnan, L.; Advani, J.; George, B.; Renuse, S.; Selvan, L. D.; Patil, A. H.; Nanjappa, V.; Radhakrishnan, A.; Prasad, S.; Subbannayya, T.; Raju, R.; Kumar, M.; Sreenivasamurthy, S. K.; Marimuthu, A.; Sathe, G. J.; Chavan, S.; Datta, K. K.; Subbannayya, Y.; Sahu, A.; Yelamanchi, S. D.; Jayaram, S.; Rajagopalan, P.; Sharma, J.; Murthy, K. R.; Syed, N.; Goel, R.; Khan, A. A.; Ahmad, S.; Dey, G.; Mudgal, K.; Chatterjee, A.; Huang, T. C.; Zhong, J.; Wu, X.; Shaw, P. G.; Freed, D.; Zahari, M. S.; Mukherjee, K. K.; Shankar, S.; Mahadevan, A.; Lam, H.; Mitchell, C. J.; Shankar, S. K.; Satishchandra, P.; Schroeder, J. T.; Sirdeshmukh, R.; Maitra, A.; Leach, S. D.; Drake, C. G.; Halushka, M. K.; Prasad, T. S.; Hruban, R. H.; Kerr, C. L.; Bader, G. D.; Iacobuzio-Donahue, C. A.; Gowda, H.; Pandey, A., A draft map of the human proteome. *Nature* **2014**, *509* (7502), 575-81.
54. Wilhelm, M.; Schlegl, J.; Hahne, H.; Moghaddas Gholami, A.; Lieberenz, M.; Savitski, M. M.; Ziegler, E.; Butzmann, L.; Gessulat, S.; Marx, H.; Mathieson, T.; Lemeer, S.; Schnatbaum, K.; Reimer, U.; Wenschuh, H.; Mollenhauer, M.; Slotta-Huspenina, J.; Boese, J. H.; Bantscheff, M.; Gerstmair, A.; Faerber, F.; Kuster, B., Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature* **2014**, *509* (7502), 582-7.
55. Zhou, H.; Di Palma, S.; Preisinger, C.; Peng, M.; Polat, A. N.; Heck, A. J.; Mohammed, S., Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome. *Journal of proteome research* **2013**, *12* (1), 260-71.
56. Zarei, M.; Sprenger, A.; Metzger, F.; Gretzmeier, C.; Dengjel, J., Comparison of ERLIC-TiO₂, HILIC-TiO₂, and SCX-TiO₂ for global phosphoproteomics approaches. *Journal of proteome research* **2011**, *10* (8), 3474-83.
57. Byrd, J. C.; Stilgenbauer, S.; Flinn, I. W., Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* **2004**, 163-83.
58. Chiorazzi, N.; Rai, K. R.; Ferrarini, M., Chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* **2005**, *352* (8), 804-15.
59. Zwiebel, J. A.; Cheson, B. D., Chronic lymphocytic leukemia: staging and prognostic factors. *Seminars in oncology* **1998**, *25* (1), 42-59.
60. Dores, G. M.; Anderson, W. F.; Curtis, R. E.; Landgren, O.; Ostroumova, E.; Bluhm, E. C.; Rabkin, C. S.; Devesa, S. S.; Linet, M. S., Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *British journal of haematology* **2007**, *139* (5), 809-19.
61. Hamblin, T. J.; Davis, Z.; Gardiner, A.; Oscier, D. G.; Stevenson, F. K., Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **1999**, *94* (6), 1848-54.
62. Crespo, M.; Bosch, F.; Villamor, N.; Bellosillo, B.; Colomer, D.; Rozman, M.; Marce, S.; Lopez-Guillermo, A.; Campo, E.; Montserrat, E., ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* **2003**, *348* (18), 1764-75.
63. Damle, R. N.; Wasil, T.; Fais, F.; Ghiotto, F.; Valetto, A.; Allen, S. L.; Buchbinder, A.; Budman, D.; Dittmar, K.; Kolitz, J.; Lichtman, S. M.; Schulman, P.; Vinciguerra, V. P.; Rai, K. R.; Ferrarini, M.; Chiorazzi, N., Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **1999**, *94* (6), 1840-7.

64. Thunberg, U.; Johnson, A.; Roos, G.; Thorn, I.; Tobin, G.; Sallstrom, J.; Sundstrom, C.; Rosenquist, R., CD38 expression is a poor predictor for VH gene mutational status and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2001**, *97* (6), 1892-4.
65. Byrd, J. C.; Furman, R. R.; Coutre, S. E.; Flinn, I. W.; Burger, J. A.; Blum, K. A.; Grant, B.; Sharman, J. P.; Coleman, M.; Wierda, W. G.; Jones, J. A.; Zhao, W.; Heerema, N. A.; Johnson, A. J.; Sukbuntherng, J.; Chang, B. Y.; Clow, F.; Hedrick, E.; Buggy, J. J.; James, D. F.; O'Brien, S., Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* **2013**, *369* (1), 32-42.
66. Herman, S. E.; Gordon, A. L.; Hertlein, E.; Ramanunni, A.; Zhang, X.; Jaglowski, S.; Flynn, J.; Jones, J.; Blum, K. A.; Buggy, J. J.; Hamdy, A.; Johnson, A. J.; Byrd, J. C., Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood* **2011**, *117* (23), 6287-96.
67. de Rooij, M. F.; Kuil, A.; Geest, C. R.; Eldering, E.; Chang, B. Y.; Buggy, J. J.; Pals, S. T.; Spaargaren, M., The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2012**, *119* (11), 2590-4.
68. Stevenson, F. K.; Krysov, S.; Davies, A. J.; Steele, A. J.; Packham, G., B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2011**, *118* (16), 4313-20.
69. Dias, A. L.; Jain, D., Ibrutinib: a new frontier in the treatment of chronic lymphocytic leukemia by Bruton's tyrosine kinase inhibition. *Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry* **2013**, *11* (4), 265-71.
70. Kashuba, E.; Eagle, G. L.; Bailey, J.; Evans, P.; Welham, K. J.; Allsup, D.; Cawkwell, L., Proteomic analysis of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukaemia reveals a possible role for kininogen. *Journal of proteomics* **2013**, *91*, 478-85.
71. Cochran, D. A.; Evans, C. A.; Blinco, D.; Burthem, J.; Stevenson, F. K.; Gaskell, S. J.; Whetton, A. D., Proteomic analysis of chronic lymphocytic leukemia subtypes with mutated or unmutated Ig V(H) genes. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2003**, *2* (12), 1331-41.
72. Eagle, G. L.; Zhuang, J.; Jenkins, R. E.; Till, K. J.; Jithesh, P. V.; Lin, K.; Johnson, G. G.; Oates, M.; Park, K.; Kitteringham, N. R.; Pettitt, A. R., Total proteome analysis identifies migration defects as a major pathogenetic factor in immunoglobulin heavy chain variable region (IGHV)-unmutated chronic lymphocytic leukemia. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2015**, *14* (4), 933-45.
73. O'Hayre, M.; Salanga, C. L.; Kipps, T. J.; Messmer, D.; Dorrestein, P. C.; Handel, T. M., Elucidating the CXCL12/CXCR4 signaling network in chronic lymphocytic leukemia through phosphoproteomics analysis. *PLoS one* **2010**, *5* (7), e11716.
74. Sharma, K.; D'Souza, R. C.; Tyanova, S.; Schaab, C.; Wisniewski, J. R.; Cox, J.; Mann, M., Ultradeep human phosphoproteome reveals a distinct regulatory nature of Tyr and Ser/Thr-based signaling. *Cell reports* **2014**, *8* (5), 1583-94.
75. Karger, B. L.; Berry, L. V., Rapid liquid-chromatographic separation of steroids on columns heavily loaded with stationary phase. *Clinical chemistry* **1971**, *17* (8), 757-64.
76. van Deemter, J. J.; Zuiderweg, F. J.; Klinkenberg, A., Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chemical Engineering Science* **1995**, *50* (24), 3869-3882.
77. MacNair, J. E.; Patel, K. D.; Jorgenson, J. W., Ultrahigh-pressure reversed-phase capillary liquid chromatography: isocratic and gradient elution using columns packed with 1.0-micron particles. *Analytical chemistry* **1999**, *71* (3), 700-8.
78. Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **1989**, *246* (4926), 64-71.

79. Konermann, L.; Ahadi, E.; Rodriguez, A. D.; Vahidi, S., Unraveling the mechanism of electrospray ionization. *Analytical chemistry* **2013**, *85* (1), 2-9.
80. Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F., Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Analytical chemistry* **1985**, *57* (14), 2935-2939.
81. Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T.; Matsuo, T., Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1988**, *2* (8), 151-153.
82. Morris, H. R.; Panico, M.; Barber, M.; Bordoli, R. S.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A., Fast atom bombardment: a new mass spectrometric method for peptide sequence analysis. *Biochemical and biophysical research communications* **1981**, *101* (2), 623-31.
83. Olsen, J. V.; Schwartz, J. C.; Griep-Raming, J.; Nielsen, M. L.; Damoc, E.; Denisov, E.; Lange, O.; Remes, P.; Taylor, D.; Splendore, M.; Wouters, E. R.; Senko, M.; Makarov, A.; Mann, M.; Horning, S., A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2009**, *8* (12), 2759-69.
84. Roepstorff, P.; Fohlman, J., Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical mass spectrometry* **1984**, *11* (11), 601.
85. Olsen, J. V.; Macek, B.; Lange, O.; Makarov, A.; Horning, S.; Mann, M., Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nature methods* **2007**, *4* (9), 709-12.
86. Wells, J. M.; McLuckey, S. A., Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins. *Methods in enzymology* **2005**, *402*, 148-85.
87. Moyer, S. C.; Cotter, R. J.; Woods, A. S., Fragmentation of phosphopeptides by atmospheric pressure MALDI and ESI/Ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, *13* (3), 274-83.
88. DeGnore, J. P.; Qin, J., Fragmentation of phosphopeptides in an ion trap mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1998**, *9* (11), 1175-88.
89. Beck, F.; Lewandrowski, U.; Wiltfang, M.; Feldmann, I.; Geiger, J.; Sickmann, A.; Zahedi, R. P., The good, the bad, the ugly: validating the mass spectrometric analysis of modified peptides. *Proteomics* **2011**, *11* (6), 1099-109.
90. Thingholm, T. E.; Jensen, O. N.; Larsen, M. R., Analytical strategies for phosphoproteomics. *Proteomics* **2009**, *9* (6), 1451-68.
91. Gallien, S.; Duriez, E.; Crone, C.; Kellmann, M.; Moehring, T.; Domon, B., Targeted proteomic quantification on quadrupole-orbitrap mass spectrometer. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2012**, *11* (12), 1709-23.
92. Kelstrup, C. D.; Young, C.; Lavalley, R.; Nielsen, M. L.; Olsen, J. V., Optimized fast and sensitive acquisition methods for shotgun proteomics on a quadrupole orbitrap mass spectrometer. *Journal of proteome research* **2012**, *11* (6), 3487-97.
93. Syka, J. E.; Coon, J. J.; Schroeder, M. J.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F., Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101* (26), 9528-33.
94. Molina, H.; Horn, D. M.; Tang, N.; Mathivanan, S.; Pandey, A., Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104* (7), 2199-204.
95. Good, D. M.; Wirtala, M.; McAlister, G. C.; Coon, J. J., Performance characteristics of electron transfer dissociation mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2007**, *6* (11), 1942-51.
96. Elias, J. E.; Gygi, S. P., Target-decoy search strategy for mass spectrometry-based proteomics. *Methods in molecular biology* **2010**, *604*, 55-71.

97. Vaudel, M.; Burkhardt, J. M.; Sickmann, A.; Martens, L.; Zahedi, R. P., Peptide identification quality control. *Proteomics* **2011**, *11* (10), 2105-14.
98. Burkhardt, J. M.; Vaudel, M.; Zahedi, R. P.; Martens, L.; Sickmann, A., iTRAQ protein quantification: a quality-controlled workflow. *Proteomics* **2011**, *11* (6), 1125-34.
99. Liu, H.; Sadygov, R. G.; Yates, J. R., 3rd, A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Analytical chemistry* **2004**, *76* (14), 4193-201.
100. Purvine, S.; Eppel, J. T.; Yi, E. C.; Goodlett, D. R., Shotgun collision-induced dissociation of peptides using a time of flight mass analyzer. *Proteomics* **2003**, *3* (6), 847-50.
101. Venable, J. D.; Dong, M. Q.; Wohlschlegel, J.; Dillin, A.; Yates, J. R., Automated approach for quantitative analysis of complex peptide mixtures from tandem mass spectra. *Nature methods* **2004**, *1* (1), 39-45.
102. Geiger, T.; Cox, J.; Ostasiewicz, P.; Wisniewski, J. R.; Mann, M., Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue. *Nature methods* **2010**, *7* (5), 383-5.
103. Ross, P. L.; Huang, Y. N.; Marchese, J. N.; Williamson, B.; Parker, K.; Hattan, S.; Khainovski, N.; Pillai, S.; Dey, S.; Daniels, S.; Purkayastha, S.; Juhasz, P.; Martin, S.; Bartlett-Jones, M.; He, F.; Jacobson, A.; Pappin, D. J., Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2004**, *3* (12), 1154-69.
104. Hsu, J. L.; Huang, S. Y.; Chow, N. H.; Chen, S. H., Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Analytical chemistry* **2003**, *75* (24), 6843-52.
105. Schmidt, A.; Kellermann, J.; Lottspeich, F., A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* **2005**, *5* (1), 4-15.
106. Matsuda, H.; Nakamura, H.; Nakajima, T., New ceramic titania: Selective adsorbent for organic phosphates. *Analytical Sciences* **1990**, *6* (6), 911-912.
107. Jensen, S. S.; Larsen, M. R., Evaluation of the impact of some experimental procedures on different phosphopeptide enrichment techniques. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **2007**, *21* (22), 3635-45.
108. Pinkse, M. W.; Uitto, P. M.; Hilhorst, M. J.; Ooms, B.; Heck, A. J., Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns. *Analytical chemistry* **2004**, *76* (14), 3935-43.
109. Larsen, M. R.; Thingholm, T. E.; Jensen, O. N.; Roepstorff, P.; Jorgensen, T. J., Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2005**, *4* (7), 873-86.
110. Thingholm, T. E.; Jensen, O. N.; Robinson, P. J.; Larsen, M. R., SIMAC (sequential elution from IMAC), a phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2008**, *7* (4), 661-71.
111. Alpert, A. J.; Andrews, P. C., Cation-exchange chromatography of peptides on poly(2-sulfoethyl aspartamide)-silica. *Journal of chromatography* **1988**, *443*, 85-96.
112. Ballif, B. A.; Villen, J.; Beausoleil, S. A.; Schwartz, D.; Gygi, S. P., Phosphoproteomic analysis of the developing mouse brain. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2004**, *3* (11), 1093-101.
113. Venne, A. S.; Vogtle, F. N.; Meisinger, C.; Sickmann, A.; Zahedi, R. P., Novel highly sensitive, specific, and straightforward strategy for comprehensive N-terminal proteomics reveals unknown substrates of the mitochondrial peptidase Icp55. *Journal of proteome research* **2013**, *12* (9), 3823-30.
114. Alpert, A. J., Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of chromatography* **1990**, *499*, 177-96.

115. Hemstrom, P.; Irgum, K., Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of separation science* **2006**, *29* (12), 1784-821.
116. Engholm-Keller, K.; Birck, P.; Storling, J.; Pociot, F.; Mandrup-Poulsen, T.; Larsen, M. R., TiSH--a robust and sensitive global phosphoproteomics strategy employing a combination of TiO₂, SIMAC, and HILIC. *Journal of proteomics* **2012**, *75* (18), 5749-61.
117. Alpert, A. J., Electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography for isocratic separation of charged solutes and selective isolation of phosphopeptides. *Analytical chemistry* **2008**, *80* (1), 62-76.
118. Alpert, A. J.; Hudecz, O.; Mechtler, K., Anion-Exchange Chromatography of Phosphopeptides: Weak Anion Exchange versus Strong Anion Exchange and Anion-Exchange Chromatography versus Electrostatic Repulsion-Hydrophilic Interaction Chromatography. *Analytical chemistry* **2015**, *87* (9), 4704-11.
119. Lorocho, S.; Zahedi, R. P.; Sickmann, A., Highly sensitive phosphoproteomics by tailoring solid-phase extraction to electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography. *Analytical chemistry* **2015**, *87* (3), 1596-604.
120. Hohenester, U. M.; Ludwig, K.; Konig, S., Chemical phosphorylation of histidine residues in proteins using potassium phosphoramidate -- a tool for the analysis of acid-labile phosphorylation. *Current drug delivery* **2013**, *10* (1), 58-63.
121. Kleinnijenhuis, A. J.; Kjeldsen, F.; Kallipolitis, B.; Haselmann, K. F.; Jensen, O. N., Analysis of histidine phosphorylation using tandem MS and ion-electron reactions. *Analytical chemistry* **2007**, *79* (19), 7450-6.
122. Napper, S.; Kindrachuk, J.; Olson, D. J.; Ambrose, S. J.; Dereniwsky, C.; Ross, A. R., Selective extraction and characterization of a histidine-phosphorylated peptide using immobilized copper(II) ion affinity chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical chemistry* **2003**, *75* (7), 1741-7.
123. Kee, J. M.; Oslund, R. C.; Perlman, D. H.; Muir, T. W., A pan-specific antibody for direct detection of protein histidine phosphorylation. *Nature chemical biology* **2013**, *9* (7), 416-21.
124. Kee, J. M.; Oslund, R. C.; Couvillon, A. D.; Muir, T. W., A second-generation phosphohistidine analog for production of phosphohistidine antibodies. *Organic letters* **2015**, *17* (2), 187-9.
125. Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T., Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research* **2003**, *13* (11), 2498-504.
126. Pallasch, C. P.; Schulz, A.; Kutsch, N.; Schwamb, J.; Hagist, S.; Kashkar, H.; Ultsch, A.; Wickenhauser, C.; Hallek, M.; Wendtner, C. M., Overexpression of TOSO in CLL is triggered by B-cell receptor signaling and associated with progressive disease. *Blood* **2008**, *112* (10), 4213-9.
127. Elbing, K.; Brent, R., Media Preparation and Bacteriological Tools. In *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.: 2001.
128. Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C., Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* **1985**, *150* (1), 76-85.
129. Schechter, I.; Berger, A., On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and biophysical research communications* **1967**, *27* (2), 157-62.
130. Wisniewski, J. R.; Zougman, A.; Nagaraj, N.; Mann, M., Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature methods* **2009**, *6* (5), 359-62.

131. Manza, L. L.; Stamer, S. L.; Ham, A. J.; Codreanu, S. G.; Liebler, D. C., Sample preparation and digestion for proteomic analyses using spin filters. *Proteomics* **2005**, *5* (7), 1742-5.
132. Premstaller, A.; Oberacher, H.; Huber, C. G., High-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of single- and double-stranded nucleic acids using monolithic capillary columns. *Analytical chemistry* **2000**, *72* (18), 4386-93.
133. Ivanov, A. R.; Zang, L.; Karger, B. L., Low-attomole electrospray ionization MS and MS/MS analysis of protein tryptic digests using 20-microm-i.d. polystyrene-divinylbenzene monolithic capillary columns. *Analytical chemistry* **2003**, *75* (20), 5306-16.
134. Larsen, M. R.; Graham, M. E.; Robinson, P. J.; Roepstorff, P., Improved detection of hydrophilic phosphopeptides using graphite powder microcolumns and mass spectrometry: evidence for in vivo doubly phosphorylated dynamin I and dynamin III. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2004**, *3* (5), 456-65.
135. Dickhut, C.; Radau, S.; Zahedi, R. P., Fast, efficient, and quality-controlled phosphopeptide enrichment from minute sample amounts using titanium dioxide. *Methods in molecular biology* **2014**, *1156*, 417-30.
136. Chambers, M. C.; Maclean, B.; Burke, R.; Amodei, D.; Ruderman, D. L.; Neumann, S.; Gatto, L.; Fischer, B.; Pratt, B.; Egertson, J.; Hoff, K.; Kessner, D.; Tasman, N.; Shulman, N.; Frewen, B.; Baker, T. A.; Brusniak, M. Y.; Paulse, C.; Creasy, D.; Flashner, L.; Kani, K.; Moulding, C.; Seymour, S. L.; Nuwaysir, L. M.; Lefebvre, B.; Kuhlmann, F.; Roark, J.; Rainer, P.; Detlev, S.; Hemenway, T.; Huhmer, A.; Langridge, J.; Connolly, B.; Chadick, T.; Holly, K.; Eckels, J.; Deutsch, E. W.; Moritz, R. L.; Katz, J. E.; Agus, D. B.; MacCoss, M.; Tabb, D. L.; Mallick, P., A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature biotechnology* **2012**, *30* (10), 918-20.
137. Kammers, K.; Cole, R. N.; Tiengwe, C.; Ruczinski, I., Detecting Significant Changes in Protein Abundance. *EuPA open proteomics* **2015**, *7*, 11-19.
138. Smyth, G. K., Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology* **2004**, *3*, Article3.
139. Wettenhall, J. M.; Smyth, G. K., limmaGUI: a graphical user interface for linear modeling of microarray data. *Bioinformatics* **2004**, *20* (18), 3705-6.
140. Snel, B.; Lehmann, G.; Bork, P.; Huynen, M. A., STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic acids research* **2000**, *28* (18), 3442-4.
141. Ashburner, M.; Ball, C. A.; Blake, J. A.; Botstein, D.; Butler, H.; Cherry, J. M.; Davis, A. P.; Dolinski, K.; Dwight, S. S.; Eppig, J. T.; Harris, M. A.; Hill, D. P.; Issel-Tarver, L.; Kasarskis, A.; Lewis, S.; Matese, J. C.; Richardson, J. E.; Ringwald, M.; Rubin, G. M.; Sherlock, G., Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics* **2000**, *25* (1), 25-9.
142. Horn, H.; Schoof, E. M.; Kim, J.; Robin, X.; Miller, M. L.; Diella, F.; Palma, A.; Cesareni, G.; Jensen, L. J.; Linding, R., KinomeXplorer: an integrated platform for kinome biology studies. *Nature methods* **2014**, *11* (6), 603-4.
143. Dyballa, N.; Metzger, S., Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *Journal of visualized experiments : JoVE* **2009**, (30).
144. Winter, D.; Kugelstadt, D.; Seidler, J.; Kappes, B.; Lehmann, W. D., Protein phosphorylation influences proteolytic cleavage and kinase substrate properties exemplified by analysis of in vitro phosphorylated Plasmodium falciparum glideosome-associated protein 45 by nano-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical biochemistry* **2009**, *393* (1), 41-7.

145. Proc, J. L.; Kuzyk, M. A.; Hardie, D. B.; Yang, J.; Smith, D. S.; Jackson, A. M.; Parker, C. E.; Borchers, C. H., A quantitative study of the effects of chaotropic agents, surfactants, and solvents on the digestion efficiency of human plasma proteins by trypsin. *Journal of proteome research* **2010**, *9* (10), 5422-37.
146. Benedetti, D.; Bomben, R.; Dal-Bo, M.; Marconi, D.; Zucchetto, A.; Degan, M.; Forconi, F.; Del-Poeta, G.; Gaidano, G.; Gattei, V., Are surrogates of IGHV gene mutational status useful in B-cell chronic lymphocytic leukemia? The example of Septin-10. *Leukemia* **2008**, *22* (1), 224-6.
147. Bohnenberger, H.; Oellerich, T.; Engelke, M.; Hsiao, H. H.; Urlaub, H.; Wienands, J., Complex phosphorylation dynamics control the composition of the Syk interactome in B cells. *European journal of immunology* **2011**, *41* (6), 1550-62.
148. Kee, J. M.; Villani, B.; Carpenter, L. R.; Muir, T. W., Development of stable phosphohistidine analogues. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (41), 14327-9.
149. Besant, P. G.; Attwood, P. V., Detection and analysis of protein histidine phosphorylation. *Molecular and cellular biochemistry* **2009**, *329* (1-2), 93-106.
150. Schmidt, A.; Ammerer, G.; Mechtler, K., Studying the fragmentation behavior of peptides with arginine phosphorylation and its influence on phospho-site localization. *Proteomics* **2013**, *13* (6), 945-54.
151. Sauer, U.; Eikmanns, B. J., The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS microbiology reviews* **2005**, *29* (4), 765-94.
152. Walmsley, S. J.; Rudnick, P. A.; Liang, Y.; Dong, Q.; Stein, S. E.; Nesvizhskii, A. I., Comprehensive analysis of protein digestion using six trypsin reveals the origin of trypsin as a significant source of variability in proteomics. *Journal of proteome research* **2013**, *12* (12), 5666-80.
153. Thevenet, P.; Shen, Y.; Maupetit, J.; Guyon, F.; Derreumaux, P.; Tuffery, P., PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. *Nucleic acids research* **2012**, *40* (Web Server issue), W288-93.
154. Swaney, D. L.; Wenger, C. D.; Coon, J. J., Value of using multiple proteases for large-scale mass spectrometry-based proteomics. *Journal of proteome research* **2010**, *9* (3), 1323-9.
155. Nishio, T.; Hayashi, R., Digestion of protein substrates by subtilisin: immobilization changes the pattern of products. *Archives of biochemistry and biophysics* **1984**, *229* (1), 304-11.
156. Gonczarowska-Jorge, H.; Dell'Aica, M.; Dickhut, C.; Zahedi, R. P., Variable Digestion Strategies for Phosphoproteomics Analysis. *Methods in molecular biology* **2016**, *1355*, 225-39.
157. Li, Q. R.; Ning, Z. B.; Tang, J. S.; Nie, S.; Zeng, R., Effect of peptide-to-TiO₂ beads ratio on phosphopeptide enrichment selectivity. *Journal of proteome research* **2009**, *8* (11), 5375-81.
158. Ficarro, S. B.; Zhang, Y.; Carrasco-Alfonso, M. J.; Garg, B.; Adelmant, G.; Webber, J. T.; Luckey, C. J.; Marto, J. A., Online nanoflow multidimensional fractionation for high efficiency phosphopeptide analysis. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2011**, *10* (11), O111 011064.
159. Thingholm, T. E.; Palmisano, G.; Kjeldsen, F.; Larsen, M. R., Undesirable charge-enhancement of isobaric tagged phosphopeptides leads to reduced identification efficiency. *Journal of proteome research* **2010**, *9* (8), 4045-52.
160. Dickhut, C.; Feldmann, I.; Lambert, J.; Zahedi, R. P., Impact of digestion conditions on phosphoproteomics. *Journal of proteome research* **2014**, *13* (6), 2761-70.

161. Elias, J. E.; Haas, W.; Faherty, B. K.; Gygi, S. P., Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations. *Nature methods* **2005**, *2* (9), 667-75.
162. Solari, F. A.; Dell'Aica, M.; Sickmann, A.; Zahedi, R. P., Why phosphoproteomics is still a challenge. *Molecular bioSystems* **2015**, *11* (6), 1487-93.
163. Savitski, M. M.; Mathieson, T.; Zinn, N.; Sweetman, G.; Doce, C.; Becher, I.; Pachel, F.; Kuster, B.; Bantscheff, M., Measuring and managing ratio compression for accurate iTRAQ/TMT quantification. *Journal of proteome research* **2013**, *12* (8), 3586-98.
164. Harshman, S. W.; Young, N. L.; Parthun, M. R.; Freitas, M. A., H1 histones: current perspectives and challenges. *Nucleic acids research* **2013**, *41* (21), 9593-609.
165. El-Gamal, D.; Williams, K.; LaFollette, T. D.; Cannon, M.; Blachly, J. S.; Zhong, Y.; Woyach, J. A.; Williams, E.; Awan, F. T.; Jones, J.; Andritsos, L.; Maddocks, K.; Wu, C. H.; Chen, C. S.; Lehman, A.; Zhang, X.; Lapalombella, R.; Byrd, J. C., PKC-beta as a therapeutic target in CLL: PKC inhibitor AEB071 demonstrates preclinical activity in CLL. *Blood* **2014**, *124* (9), 1481-91.
166. Lopez-Guerra, M.; Colomer, D., NF-kappaB as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Expert opinion on therapeutic targets* **2010**, *14* (3), 275-88.
167. Reddy, S. P.; Natarajan, V.; Dudek, A. Z., MARCKS is marked in combating lung cancer growth and acquired resistance. *American journal of respiratory and critical care medicine* **2014**, *190* (10), 1084-6.
168. Paterson, A.; Mockridge, C. I.; Adams, J. E.; Krysov, S.; Potter, K. N.; Duncombe, A. S.; Cook, S. J.; Stevenson, F. K.; Packham, G., Mechanisms and clinical significance of BIM phosphorylation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2012**, *119* (7), 1726-36.
169. Kwon, O.; Georgellis, D.; Lin, E. C., Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the arc two-component system of Escherichia coli. *Journal of bacteriology* **2000**, *182* (13), 3858-62.
170. Attwood, P. V., Histidine kinases from bacteria to humans. *Biochemical Society transactions* **2013**, *41* (4), 1023-8.
171. Medzihradszky, K. F.; Chalkley, R. J., Lessons in de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews* **2015**, *34* (1), 43-63.
172. Weinert, B. T.; Iesmantavicius, V.; Wagner, S. A.; Scholz, C.; Gummesson, B.; Beli, P.; Nystrom, T.; Choudhary, C., Acetyl-phosphate is a critical determinant of lysine acetylation in E. coli. *Molecular cell* **2013**, *51* (2), 265-72.
173. Kim, Y.; Huang, J.; Cohen, P.; Matthews, H. R., Protein phosphatases 1, 2A, and 2C are protein histidine phosphatases. *The Journal of biological chemistry* **1993**, *268* (25), 18513-8.

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich als erstes ganz herzlich bei Prof. Dr. Albert Sickmann, meinem Doktorvater, für das interessante Thema und für die Begleitung der Promotion über die letzten Jahre bedanken.

Mein Dank gilt zudem Prof. Dr. Jörg Tiller und Prof. Dr. Oliver Kayser für ihre Bereitschaft als Prüfer der Promotion mitzuwirken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. René Zahedi, der als Arbeitsgruppenleiter und Betreuer dieser Arbeit stets neue Ideen einbrachte, immer für kritische Diskussionen bereit stand und mir das selbständige Arbeiten in den verschiedenen Projekten ermöglichte.

Ein weiteres Dankeschön geht an meine Kooperationspartner:

Zum einen aus dem CECAD in Köln, an Dr. Lukas Frenzel und Dr. Valeska Berg, die mit der Bereitstellung der klinischen Proben sowie ihrem medizinischem Fachwissen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, zum anderen an Dr. Christian Hedberg und seine ehemalige Arbeitsgruppe aus dem MPI in Dortmund, für das Einbringen ihrer chemischen Fachkenntnisse und die Bereitstellung des anti-pHis Antikörpers.

Mein Dank gilt meiner Kollegin Dr. Sonja Radau für die Zusammenarbeit bei der Optimierung der Phosphopeptidanreicherung sowie Etienne Beltzung (ehemals Technische Universität Wien) für die Bereitstellung und Anpassung des Algorithmus ptmRS.

Ein Dankeschön geht auch an meine Kollegen aus der Arbeitsgruppe Systemanalyse am ISAS Dortmund, insbesondere an Dr. Sonja Radau, Dr. Florian Beck, Dr. Julia Burkhart, Laxmikanth Kollipara und Saskia Venne, für die anregenden Diskussionen, aber vor allem für die nette Atmosphäre im Labor und die schöne Zeit, die wir in den letzten Jahren hatten.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund bedanken, die mich in all den Jahren unterstützt haben. Danke, für die vielen aufmunternden Worte und eure Geduld.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Clarissa Dickhut
Adresse	Pfinzstr.1, 76337 Waldbronn
Geburtsdatum	23.12.1986
Geburtsort	Lippstadt
Familienstand	ledig

Schulbildung

08/1993-07/1997	Luzia-Grundschule, Rüthen-Oestereiden
08/1997-06/2006	Friedrich-Spee-Gymnasium Rüthen Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/2006-09/2009	Bachelorstudiengang Life Science, Leibniz Universität Hannover Abschluss: Bachelor of Science
10/2009-09/2011	Masterstudiengang Biomedizin, Medizinische Hochschule Hannover Abschluss: Master of Science
Seit 11/2011	Promotion an der Technischen Universität Dortmund, Fachbereich Bio- und Chemieingenieurwesen/ISAS Dortmund

11. Erklärung

§ 8 (2) 4.

Ich erkläre, dass beim Verfassen der eingereichten Dissertation keine anderen als die angegebenen Personen mitgewirkt haben, nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und übernommene Stellen als solche gekennzeichnet wurden.

§ 8 (2) 6.

Ich erkläre, dass ich bisher keinen Promotionsversuch unternommen habe.

§ 8 (3) 4.

Ich widerspreche der Zulassung der Öffentlichkeit bei der mündlichen Prüfung.

Waldbronn, den

(Unterschrift Doktorandin/Doktorand)

12. Anhang

Tabelle 12-1: Differentielle Phosphopeptidsequenzen zwischen uIgVH und mIgVH CLL-Patienten (basale Phosphorylierung, Vergleich uIgVH vs. mIgVH). Schwellenwerte für eine signifikante Regulation: $p \leq 0,05$ (p.mod) sowie $\log_2 \text{fold change} > (\text{MD} + 3 \cdot \text{SD})$. phosphoRS-Wert ≥ 90 %.

Sequenz	Accession	Genname	pStelle Protein	Log ₂ FC	p.mod
TRPSSTVIK	Q5SSJ5	HP1BP3	S512	4,69	6,38E-04
SVSTSPSILTAFLK	Q6ZVF9	GPRIN3	T335	3,55	2,14E-05
IYFPIR	Q5XKP0	QIL1	Y77	3,43	1,04E-04
SASVNKEPVSPLGIMR	Q8WWI1	LMO7	S1493	3,34	2,52E-02
EILVGDVVGQTVDDPYATFVK	P23528	CFL1	Y68	3,17	2,99E-03
LIYEDYVSILSPK	P49795	RGS19	Y143	3,14	7,06E-04
MAPVPLDDSNRPASLTK	Q9NYF8	BCLAF1	S564	2,82	4,17E-04
YGSQEHPIGDK	Q14644	RASA3	S809	2,82	1,55E-03
KPLTSSSAAPQRPSTQR	Q15691	MAPRE1	S165	2,74	6,12E-04
DLVMGSSPQLK	Q53LP3	SOWAHC	S213	2,73	4,70E-05
IISIFSGTEK	Q13177	PAK2	S55	2,64	9,11E-03
ISMPLDLHLKSPK	Q09666	AHNAK	S2397	2,61	4,24E-02
ESHPHGVK	O00193	SMAP	S7	2,60	1,08E-04
LLSGSESSK	Q5BKY9	FAM133B	S82	2,57	2,58E-04
SIDPALSMLIK	Q9H501	ESF1	S823	2,55	3,50E-05
YDEELEGERPHSFR	O43290	SART1	S348	2,55	2,33E-04
SPGLK	Q6JBY9	RCSD1	S108	2,44	3,02E-02
RFSGTVR	P62906	RPL10A	S50	2,43	8,26E-04
FSNISAAC	P50991	CCT4	S36	2,41	7,44E-05
TLHSDDEGTVLDDSR	O00170	AIP	S43	2,40	2,09E-03
VLSIGDGIAR	P25705	ATP5A1	S76	2,34	1,05E-02
YSVDIPLDK	P61353	RPL27	S86	2,30	2,95E-02
DGFPSGTPALNAK	Q13177	PAK2	S152	2,29	1,77E-03
ELLTTMGDRFTDEEVDELYR	P19105	MYL12A	T134	2,29	4,56E-02
YGYTHLSTGDLLR	P00568	AK1	S38	2,29	2,16E-04
ETFSSAEGTVDK	P46100	ATRX	S889	2,26	3,01E-04
VADNSFDAK	Q14978	NOLC1	S643	2,26	4,43E-02
EPLIYESDR	O95466	FMNL1	S1059	2,24	1,32E-02
LEKSPLAGNK	O75151	PHF2	S625	2,24	8,35E-03
GSYGLGGPIITTQVTIPK	P61978	HNRNPK	Y380	2,19	2,36E-03
ASSSGFPGAR	Q13233	MAP3K1	S10	2,15	1,88E-04
SVSSFPVPQDNVDTHPGSGK	Q676U5	ATG16L1	S287	2,15	2,02E-03
EAIYSGYIR	A6NHR9	SMCHD1	Y283	2,14	9,01E-04
SGSISVK	Q8TF01	PNISR	S726	2,13	4,39E-02
LVSQDNFGFDLPAVEAATK	Q01082	SPTBN1	S446	2,13	3,62E-03
SGVSITIDDPVR	Q9UKV3	ACIN1	S990	2,12	1,04E-03
RPSESDKEDELDK	Q02952	AKAP12	S627	2,11	4,37E-04
EGFESDTESEFTFK	Q8WWI1	LMO7	S276	2,10	3,40E-03
LQEESDLELAK	O75822	EIF3J	S127	2,10	9,93E-05
SFEELR	Q9NUU7	DDX19A	S92	2,10	1,70E-02
VLAELYVSDR	O43776	NARS	S9	2,09	3,25E-02
MSSTIFSTGGK	Q13177	PAK2	S20	2,09	8,65E-03
LSAEYEK	Q02952	AKAP12	S371	2,06	7,32E-04
SPPSPVER	Q02952	AKAP12	S1331	2,06	7,27E-05
RGSSSDEEGGPK	Q02952	AKAP12	S697	2,05	2,29E-04

ALRPPTSPGVFGALQNFK	O75151	PHF2	T654	2,05	1,15E-03
NLVPGESVYGEK	P22087	FBL	Y118	2,05	6,20E-04
MQFSFEGPEK	Q6DN90	IQSEC1	S180	2,04	1,89E-02
FEPQVDTEAEDMISAVK	Q9UIG0	BAZ1B	T833	2,03	1,58E-03
TIYVR	P07948	LYN	Y32	2,02	2,90E-04
ENSRPDSSLPETSK	Q13426	XRCC4	S303	1,98	7,93E-04
GFGSLSNLPR	Q8N5H7	SH2D3C	S22	1,97	7,85E-04
EGVTPWASFK	Q02952	AKAP12	S612	1,96	3,17E-04
LGGFGSKR	Q14839	CHD4	S303	1,94	5,45E-03
DVDYSDALTEK	P51531	SMARCA2	S1317	1,93	4,49E-02
SFPDFPTPGVVFR	P07741	APRT	S15	1,92	5,18E-04
KPSGGSSK	Q5SSJ5	HP1BP3	S523	1,92	7,62E-03
SISVDLAESK	Q9H410	DSN1	S125	1,92	5,05E-04
SVAGLR	P17026	ZNF22	S219	1,90	3,64E-04
ALSIVADD	Q9NQY0	BIN3	S248	1,89	1,78E-03
ASPAPDDTDDTPQELK	Q8WVN9	IPCEF1	S411	1,85	1,94E-04
VSAGEPGSHPSAPR	Q9Y4F1	FARPI	S427	1,85	4,66E-03
IIITEPSD	Q9NSI8	SAMSN1	S372	1,84	1,92E-03
STLNPQWNESFTFK	P17252	PRKCA	S226	1,83	1,35E-02
LTYQFSGEVLGR	P17947	SPII	T249	1,82	1,06E-02
RDSVLTSK	O75937	DNAJC8	S35	1,81	4,49E-02
STPQPPSGK	P35269	GTF2F1	S436	1,81	4,60E-03
AISSDMFFGR	Q8N6H7	ARFGAP2	S432	1,80	3,97E-03
VRPASTGGLSLLPPPPGGK	Q9NVZ3	NECAP2	S181	1,79	5,40E-04
LSEISAR	Q8TC05	MDM1	S686	1,78	2,07E-02
LGGSAVISLEGKPL	P23528	CFL1	S160	1,77	9,65E-03
GFGFVDFNSEEDAK	P19338	NCL	S619	1,77	4,48E-03
LGSALLIR	Q14993	COL19A1	S81	1,75	2,45E-03
LIGEYGLR	P46781	RPS9	Y35	1,74	7,61E-03
LVVGSFSR	O75038	PLCH2	S579	1,74	1,45E-02
SVVSDLEADDVK	P11388	TOP2A	S1377	1,74	3,83E-03
SLSPILPGR	Q6ZSZ5	ARHGEF18	S1101	1,73	1,99E-03
GFGGQYGIQK	P14317	HCLS1	Y198	1,73	1,02E-03
SGAMVK	P14866	HNRNPL	S29	1,73	2,14E-03
FTDEEVDELRYR	P19105	MYL12A	T134	1,72	4,53E-02
RPSESDKEDELDKVK	Q02952	AKAP12	S627	1,72	2,70E-04
LSSPVLHR	Q16643	DBN1	S142	1,70	1,36E-03
GPAYGLSR	P37802	TAGLN2	Y8	1,70	7,62E-04
SLHLDK	Q96T37	RBM15	S97	1,70	1,01E-02
SHSNLGVKDGDSGR	P10912	GHR	S375	1,69	4,54E-03
VLATDFDDEFDDEEPLPAIGTCK	Q96RU3	FNBP1	T537	1,69	1,52E-03
LFIGGLSFETTDDSLR	P51991	HNRNPA3	S43	1,68	2,61E-03
LTYQFSGEVLGR	P17947	SPII	S253	1,68	4,93E-03
LPSPSPFSSLSQDQAATSK	Q8WWI1	LMO7	S988;S991	1,67	2,26E-02
GEFDPGQDTYQHPPK	Q99798	ACO2	T543	1,66	3,04E-03
RPSPHDEEEFEVEEAQAEPK	P11137	MAP2	S1324	1,66	3,10E-04
RISGVDR	O15239	NDUFA1	S55	1,64	4,54E-03
SIEQAEEAHK	P31629	HIVEP2	S169	1,62	2,37E-03
SVIEPLPVTPTTR	Q13153	PAK1	S204	1,60	1,29E-04
SLTESLESILSR	Q86TI0	TBC1D1	S507	1,60	1,65E-02
KASFDHSPDSLPLR	Q8NB78	KDM1B	S13	1,60	4,61E-02
TISQSSSLK	Q9UHB7	AFF4	S836	1,60	1,35E-03
YSGAYGASVSDEELK	Q9NX63	CHCHD3	S50	1,60	2,66E-03

TASLVTR	Q7L7X3	TAOK1	S445	1,59	9,80E-03
SLVESVSSSPNK	Q9H2U2	PPA2	S317	1,59	3,94E-04
TKSLEITGER	Q5T200	ZC3H13	S1240	1,59	3,98E-02
LPSPTSPFSSLSQDQAATSK	Q8WWI1	LMO7	S988	1,58	4,86E-03
SVDFDSLTVR	Q9Y5K6	CD2AP	S458	1,58	2,50E-03
LALDMEISAYR	P20700	LMNB1	S375	1,58	3,12E-03
EDSFESLDSLGSR	Q8WWI1	LMO7	S246	1,58	6,63E-04
LSLEGDHSTPPSAYGSVK	A6NMY6	ANXA2P2	Y24	1,58	8,21E-03
SFDGNTLLNR	Q05209	PTPN12	S449	1,58	4,88E-02
DDEEADAIYAALDKR	O94906	PRPF6	Y105	1,58	5,30E-03
SLPGGTASSR	Q9HB58	SP110	S296	-1,14	8,45E-03
GSPQAGVDLSFATR	Q13884	SNTB1	S389	-1,14	3,39E-02
KPSGLNGEASKSQEMVHLVNK	P16070	CD44	S697;S706	-1,20	3,22E-03
RGSYPFIDFR	Q9NP56	PDE7B	S45	-1,24	1,95E-03
KLSCSLEDLR	Q8ND30	PPFIBP2	S387	-1,26	5,56E-03
LSCSLEDLR	Q8ND30	PPFIBP2	S387	-1,27	1,60E-03
ITSEAEDLVANFFPK	P61289	PSME3	S24	-1,30	2,37E-02
LVGIVTSR	P20839	IMPDH1	S160	-1,33	1,20E-03
CSSPTVGPPPLPQK	Q8ND30	PPFIBP2	S363	-1,35	7,17E-03
ISPPLPFLSLSGGPR	Q9BZB8	CPEB1	S208	-1,37	2,61E-03
QQSPQEPK	Q9UHB6	LIMA1	S698	-1,43	3,85E-02
TSSVVTLEVAK	P55196	MLLT4	S1083	-1,51	2,87E-05
GEPAAAAAPEAGASPVEK	P29966	MARCKS	S101	-1,62	5,83E-03
DMSPLSETEMALGKDVTPPETEVVLIK	P27816	MAP4	T521	-1,71	2,35E-02
KAPSPPSK	Q53SF7	COBLL1	S404	-1,73	7,09E-03
AKSTQDLSEGISR	P24588	AKAP5	S178	-1,82	4,62E-02
SPGPKPEGLLAQLCK	Q5VT06	CEP350	S939	-2,08	3,91E-04
EHSPDEFIKDEQNK	Q13287	NMI	S16	-2,39	2,15E-02
MGAPESGLAEYLFDKHTLGSDNES	P02794	FTH1	S183	-2,78	1,75E-02
AEDGATSPSPNETPK	P29966	MARCKS	T150	-2,80	4,96E-02
LSGFSEFK	P29966	MARCKS	S170	-3,78	1,19E-03

Tabelle 12-2: Differentielle Phosphopeptidsequenzen in uIgVH-Patienten nach IgM-Stimulation (IgM vs. nat). Schwellenwerte für eine signifikante Regulation: $p \leq 0,05$ sowie $\log_2 \text{fold change} > (\text{MD} + 3 \cdot \text{SD})$. phosphoRS-Wert ≥ 90 %.

Sequenz	Accession	Genname	pStelle Protein	Log ₂ FC	p.mod
LVTLISR	Q7L591	DOK3	S483	2,88	1,22E-03
ILRLSTFEK	O94804	STK10	S13	2,29	6,06E-04
SDLSLGSR	Q96RF0	SNX18	S202	2,19	3,84E-03
RASGQAFELILSPR	P16949	STMN1	S16 S25	2,09	5,10E-03
SLSIEIGHEVK	O15155	BET1	S50	2,00	1,03E-02
ASGQAFELILSPR	P16949	STMN1	S25	1,99	3,21E-03
NSPTFKSFEEK	P55327	TPD52	S176	1,91	1,68E-02
FQSLGVAFYR	P51149	RAB7A	S72	1,85	1,19E-03
SLSLPGLR	Q6ZW13	C16orf86	S114	1,71	2,77E-03
ILSLSEEGSLER	Q9Y4G8	RAPGEF2	S1089	1,62	9,52E-03
AEAPPLEREDSGTFSLGK	O75569	PRKRA	S18	1,61	1,40E-02
FGTFGGLGSK	Q09666	AHNAK	S5830	1,55	6,46E-03
ASGQAFELILSPR	P16949	STMN1	S16;S25	1,54	5,83E-04
KASSEGGTAAGAGLDSLHK	O15143	ARPC1B	S310	1,51	5,98E-03
SAESPTSPVTSETGSTFK	Q02952	AKAP12	T285	1,49	3,45E-02

Anhang

VAAETQSPSLFGSTK	Q9UKX7	NUP50	S221	1,45	4,02E-03
NSATFKSFEDR	O43399	TPD52L2	S166	1,43	4,22E-03
SYSFPKPGHR	P43405	SYK	S297	1,42	3,98E-03
DLHGDLLSPR	A2A288	ZC3H12D	S428	1,41	4,29E-02
AMVSPFHSPPTPSSPGVR	Q6JBY9	RCSD1	S120;S127	1,40	2,64E-03
KQHEGSK	P49591	SARS	S491	1,38	9,55E-03
MPFLSISSPK	Q09666	AHNAK	S3412	1,37	1,96E-02
FKAEAPLPSPK	Q09666	AHNAK	S5110	1,36	6,05E-03
FAVLVEPPMSLPGAGLSSQELSGGPGDGP	Q13263	TRIM28	S816	1,36	2,21E-02
LQANLTFDPAALLPGASPKSPGLK	Q6JBY9	RCSD1	S105;S108	1,32	4,03E-02
SPLFIFMR	O43521	BCL2L11	S77	1,32	2,24E-03
TISSNSFSPEVFLPVDVEK	Q9H714	KIAA0226L	S190	1,32	1,95E-03
LKSEGDVEGDLGETQSR	Q09666	AHNAK	S135	1,28	3,26E-03
VSMPDVELNLKSPK	Q09666	AHNAK	S3426	1,28	1,83E-03
LRDSITR	Q6ZUJ8	PIK3AP1	S656	1,23	1,71E-02
SGSISVK	Q8TF01	PNISR	S726	1,22	7,00E-03
GHYEVTGSDDETGKLQSGVSLASK	Q09666	AHNAK	T5839	1,20	1,87E-02
SISSDGRPLER	O43166	SIPAIL1	S1116	1,18	5,52E-03
LLQFYPSLEDPASSR	Q9GZY6	LAT2	S86	1,17	2,73E-03
TQEGSLAR	P78527	PRKDC	T2620	1,17	2,29E-02
AGGTALLPGPPAPSPLPATPLSAK	Q6ZSZ5	ARHGEF18	S1160	1,16	2,59E-03
QASDTGSNDAHNK	P20810	CAST	S71	1,15	3,89E-02
AASLTEDRDR	Q04637	EIF4G1	S1209	1,15	1,71E-03
VDIDTPDINIEGSEK	Q09666	AHNAK	T3716	1,14	2,65E-02
SLLSNVSIEDDEEELVAIVR	Q5T5Y3	CAMSAP1	S534	1,13	1,24E-02
SDVEIPATVTAFSFEDDTVPLSPLK	Q9UEY8	ADD3	S423	1,12	2,05E-02
DYDSPERER	P52756	RBM5	S59	1,10	1,84E-03
RKSHEAEVLK	P16949	STMN1	S63	1,08	4,56E-03
ALSFDNR	Q02156	PRKCE	S368	1,06	1,57E-02
SLRDPASPGR	O75064	DENND4B	S953	1,04	3,34E-02
SVIEPLVTPTR	Q13153	PAK1	T212	1,04	4,96E-02
EALAEAALESPRALVR	O14745	SLC9A3R1	S280	1,03	1,26E-02
SFPLTR	Q14005	IL16	S966	1,03	2,94E-02
AEAPLPSPK	Q09666	AHNAK	S5110	1,03	2,28E-02
QLSVEVQDSIHR	Q8TB24	RIN3	S850	1,03	1,02E-02
LIDRTESLNR	P33241	LSP1	S204	1,02	3,17E-02
NSPVTKTPPR	Q13541	EIF4EBP1	S65;T70	1,01	4,89E-04
LLSEGSVGGEGCR	Q9Y4F9	FAM65B	S585	1,01	3,74E-03
TEPLISPGCDR	Q6PJW8	CNST	S436	1,01	3,08E-02
ASSRVSGFPEDSSK	O15400	STX7	S129	0,99	1,21E-03
VDIDTPDIDIHGPEGK	Q09666	AHNAK	T4100	0,99	2,58E-02
GLEFPMTDLDMLSPIHTPQR	O60784	TOM1	S160	0,98	3,92E-02
ISSFETFGSSQLPDK	Q14005	IL16	S845	0,96	8,85E-03
L TSAEVP MATDR	Q9Y4F9	FAM65B	T572	0,96	9,39E-03
SESELIDELSEDFDR	P20810	CAST	S366	0,94	3,60E-03
SGFGEISSPVIR	P57740	NUP107	S11	0,94	3,33E-02
TLSVEQR	Q5XPI4	RNF123	S711	0,94	1,70E-02
GSGFSLDVIDGPISQR	O43166	SIPAIL1	S258	0,93	8,98E-03
KILNDLSSDAPGVPR	P16220	CREB1	S142	0,93	6,99E-03
AAISQLRSPR	O95747	OXSRI	S359	0,91	4,14E-02
IVAPTVSQINAEFVTQLACK	O60306	AQR	S16	0,91	1,29E-02
LLSTQAEESQGPVLK	Q14005	IL16	S946	0,89	3,19E-02
L TSAEVP MATDR	Q9Y4F9	FAM65B	S573	0,89	4,02E-02

ESVPEFPLSPPK	P16949	STMN1	S38	0,88	5,01E-03
LRSPFLQK	Q9UJU6	DBNL	S283	0,88	4,57E-02
TQEGSL SAR	P78527	PRKDC	S2624	0,88	2,77E-02
SLVISPPVR	Q9UBW5	BIN2	S263	0,87	4,04E-02
ISEYKPLNMAGVEQPPPELR	Q9Y468	L3MBTL1	S49	0,87	1,02E-02
LLGPSAAADILQLSSSLPLQSR	Q7Z6Z7	HUWE1	S2595	0,87	8,20E-03
SLDQTSPCPLVLR	Q6XZF7	DNMBP	S684	0,84	3,07E-02
IPSFPSPEPPSPSAPSIK	Q12802	AKAP13	S2709	0,83	4,02E-02
EAAFGGGLLSPGPEAT	Q01201	RELB	S573	0,83	1,69E-02
ASSFSGISVLTR	Q15032	R3HDM1	S380	0,83	3,67E-02
QKSEEPSVSIPFLQTALLR	Q5SW79	CEP170	S446	0,82	2,80E-02
GSYGDLGGPIITTQVTIPK	P61978	HNRNPK	Y380	-0,77	3,54E-02
SNSPLPVPPSK	Q13247	SRSF6	S301;S303	-0,77	4,12E-02
EIAIVHSDAEK	Q9H307	PNN	S347	-0,80	1,51E-02
SKPNLPSESR	Q08170	SRSF4	S458	-0,80	3,15E-02
LIGEYGLR	P46781	RPS9	Y35	-0,83	2,14E-02
EAIYSYIR	A6NHR9	SMCHD1	Y283	-1,01	9,56E-03
NLVPGESVYGEK	P22087	FBL	Y118	-1,14	1,50E-02
AGGSAALSPSK	Q92522	H1FX	S31	-1,14	1,48E-02
RLSFAVPPFR	P78527	PRKDC	S893	-1,33	1,98E-02
QETKQDDK	O60287	URB1	T523	-1,33	1,76E-02
LLSGSESSK	Q5BKY9	FAM133B	S82	-1,35	1,99E-03
LIYEDYVSILSPK	P49795	RGS19	Y143	-1,36	1,07E-02
KATGAATPK	P10412	HIST1H1E	T146	-2,10	1,12E-02
KAAGGATPK	P16403	HIST1H1C	T146	-2,33	4,92E-02
ATGAATPK	P10412	HIST1H1E	T146	-2,42	6,75E-03

Tabelle 12-3: Differentielle Phosphopeptidsequenzen in mIgVH-Patienten nach IgM-Stimulation (IgM vs. nat). Schwellenwerte für eine signifikante Regulation: $p \leq 0,05$ sowie $\log_2 \text{fold change} > (\text{MD} + 3 \cdot \text{SD})$. phosphoRS-Wert $\geq 90\%$.

Sequenz	Accession	Genname	pStelle Protein	Log ₂ FC	p.mod
LVTLLSR	Q7L591	DOK3	S483	2,69	3,84E-03
SPLFIFMR	O43521	BCL2L11	S77	2,61	1,68E-04
TRPSSTVIK	Q5SSJ5	HP1BP3	S512	2,09	3,82E-02
FQSLGVAFYR	P51149	RAB7A	S72	1,81	1,57E-02
SVSTSPSILTAFLK	Q6ZVF9	GPRIN3	T335	1,61	2,39E-02
ALSFDNR	Q02156	PRKCE	S368	1,58	2,32E-02
KASSEGGTAAGAGLDSLHK	O15143	ARPC1B	S310	1,49	2,72E-02
LTYQFSGEVLGR	P17947	SPI1	S253	1,43	7,54E-03
ESHPHGVK	O00193	SMAP	S7	1,36	1,12E-02
TISSNSFSPEVFLPVDVEK	Q9H714	KIAA0226L	S190	1,31	6,71E-03
TLPQESLEIELAEKPKV	Q5VZK9	LRRC16A	S880	1,20	9,93E-03
MGAPESGLAEYLFDKHTLGSDNES	P02794	FTH1	S183	1,17	3,84E-02
FEPQVDTEAEDMISAVK	Q9UIG0	BAZ1B	T833	1,14	4,45E-02
KPLTSSAAPQRPISTQR	Q15691	MAPRE1	S165	1,13	4,77E-02
QESVF	Q86VZ1	P2RY8	S357	1,11	4,66E-03
AGGTALLPGPPAPSPPLATPLSAK	Q6ZSZ5	ARHGEF18	S1160	1,06	3,14E-02
SGFGEISSPVIR	P57740	NUP107	S11	1,06	4,21E-02
LRDSITR	Q6ZUJ8	PIK3API	S656	1,04	3,38E-02
TQEGSL SAR	P78527	PRKDC	T2620	1,04	3,30E-02
LIYEDYVSILSPK	P49795	RGS19	Y143	1,04	3,30E-02

TASLVTR	Q7L7X3	TAOK1	S445	1,03	4,73E-02
IISIFSGTEK	Q13177	PAK2	S58	1,01	1,33E-02
ISFVEEDVHPK	Q8WYP5	AHCTF1	S1232	1,01	1,68E-02
KPGSVVAAAAAEAK	P51608	MECP2	S274	0,99	5,03E-03
ASTSKSESSQK	P62753	RPS6	S244	0,96	6,82E-03
EDVYENLHTK	P29350	PTPN6	Y564	0,96	3,05E-02
VGPATPSAQVGK	Q13428	TCOF1	T533	0,95	2,13E-02
QITMEELVR	Q15149	PLEC	T4030	0,95	4,98E-02
AKSPSQK	O75367	H2AFY	S138	0,93	1,01E-02
VSSLLNR	Q9UHW9	SLC12A6	S148	0,91	1,19E-02
SIDPALSMLIK	Q9H501	ESF1	S823	0,90	1,96E-02
TQSTFDPFEKPANQVK	O94921	CDK14	S78	0,89	3,10E-02
FSNISAAC	P50991	CCT4	S36	0,88	1,11E-02
QSPSPSTRPIR	Q8IYB3	SRRM1	S715	-0,82	1,09E-02
SELNEIKENQRSPVR	Q13427	PPIG	S397	-0,84	1,16E-02
SPSPAPPPR	Q8IYB3	SRRM1	S560	-0,88	1,35E-02
KAAGGATPK	P16403	HIST1H1C	T146	-1,09	3,81E-02

Tabelle 12-4: Differentielle Phosphopeptidsequenzen in uIgVH-Patienten nach Zugabe des BTK-Inhibitors Ibrutinib und anschließender IgM-Stimulation (IgM-Ibr vs. IgM). Schwellenwerte für eine signifikante Regulation: $p \leq 0,05$ sowie $\log_2 \text{fold change} > (\text{MD} + 3 \cdot \text{SD})$. phosphoRS-Wert $\geq 90\%$.

Sequenz	Accession	Genname	pStelle Protein	Log ₂ FC	p.mod
ELPSAVSR	O00429	DNM1L	S529	-0,56	3,47E-02
APGSPLSSEGAAGEGVR	Q6JBY9	RCSD1	S219	-0,56	1,31E-02
LLQFYPSLEDPASSR	Q9GZY6	LAT2	S86	-0,56	2,96E-02
EAAFGGGLLSPGPEAT	Q01201	RELB	S573	-0,57	3,80E-02
IPSFPPSPPEPPSPSPSIK	Q12802	AKAP13	S2709	-0,57	1,79E-02
ELFDDPSYVNVQNLDK	P29353	SHC1	S426	-0,57	3,78E-02
TPTAPAVNLAGAR	Q9UQ35	SRRM2	T2289	-0,59	3,79E-02
GPAFNMASPESDFGINLK	Q09666	AHNAK	S5552	-0,60	3,92E-02
ISMPDLDLHLKSPK	Q09666	AHNAK	S2397	-0,62	1,85E-02
EALAEAALESPRALVR	O14745	SLC9A3R1	S280	-0,62	4,86E-02
HSSPHQSEDEEDPR	P13807	GYS1	S652;S657	-0,62	2,22E-02
TEPLISPGCDR	Q6PJW8	CNST	S436	-0,63	3,89E-02
LRLSTDVVEHSLDNK	P42575	CASP2	S157	-0,63	2,44E-02
NLVSPAMR	Q14686	NCOA6	S1481	-0,64	2,74E-02
VDTDNGYISFNELNDFK	P13796	LCP1	Y28	-0,67	2,38E-02
LGTSESLPCTAEELSR	Q9BZL6	PRKD2	S214	-0,71	2,03E-02
SESELIDELSEDFDR	P20810	CAST	S366	-0,76	1,02E-02
SSVQDFICVSYLEPEQAR	Q8TB24	RIN3	S875	-0,77	2,43E-02
HRSNSFSDER	Q09666	AHNAK	S5780;S5782	-0,79	1,21E-02
TISSNSFSPEVFLPVDVEK	Q9H714	KIAA0226L	S190	-0,79	2,29E-02
IVAPTVSQINAEFVTQLACK	O60306	AQR	S16	-0,80	1,06E-02
SPGLK	Q6JBY9	RCSD1	S108	-0,80	2,56E-02
LLSEGSVGGEGEGR	Q9Y4F9	FAM65B	S585	-0,81	2,79E-03
VAAETQSPSLFGSTK	Q9UKX7	NUP50	S221	-0,81	4,22E-02
LKSEDGVEGDLGETQSR	Q09666	AHNAK	S135	-0,82	2,17E-02
FKAEAPLPSPK	Q09666	AHNAK	S5110	-0,86	3,00E-02
SLSIEIGHEVK	O15155	BET1	S50	-0,90	3,04E-02
AGGTALLPGPPAPSPPLATPLSAK	Q6ZSZ5	ARHGEF18	S1160	-0,91	3,97E-03
LRDSITR	Q6ZUJ8	PIK3AP1	S656	-0,91	6,60E-04

RASGQAFELILSPR	P16949	STMN1	S16;S25	-0,92	1,01E-02
LPSGSGAASPTGSAVDIR	Q09666	AHNAK	S210	-0,94	1,23E-02
QLSVEVQDSIHR	Q8TB24	RIN3	S850	-0,94	3,17E-02
QVLQSTQSPR	Q9Y2D5	AKAP2	S748	-1,04	1,59E-02
SPLFIFMR	O43521	BCL2L11	S77	-1,11	7,43E-03
ASGQAFELILSPR	P16949	STMN1	S16;S25	-1,16	2,19E-03
ASGQAFELILSPR	P16949	STMN1	S25	-1,47	1,71E-02
AMVSPFHSPSTPSSPGVR	Q6JBY9	RCSD1	S120;S127	-1,47	1,68E-03

Tabelle 12-5: Differentielle Phosphopeptidsequenzen in mIgVH-Patienten nach Zugabe des BTK-Inhibitors Ibrutinib und anschließender IgM-Stimulation (IgM-Ibr vs. IgM). Schwellenwerte für eine signifikante Regulation: $p \leq 0,05$ sowie $\log_2 \text{fold change} > (\text{MD} + 3 \cdot \text{SD})$. phosphoRS-Wert $\geq 90\%$.

Sequenz	Accession	Genname	pStelle Protein	Log ₂ FC	p.mod
SPSRTEKQEEDR	Q6JBY9	RCSD1	T246	1,13	3,99E-03
MGPSGGEGMEPERRDSQDGSSYR	Q14847	LASP1	S146	0,94	5,41E-03
TLMDKGF	P17858	PFKL	S775	0,91	1,78E-02
DYDPERER	P52756	RBM5	S59	0,72	2,08E-02
AASLTEDRDR	Q04637	EIF4G1	S1209	0,66	1,21E-02
TVSFSSMPTEK	Q9UPR0	PLCL2	S123	-0,56	4,18E-02
LIYLVPEK	Q9NZM3	ITSN2	Y553	-0,62	3,51E-02
RSSKSFSLDEPPLFIPDNIATR	Q92576	PHF3	S678;S680	-0,69	4,86E-02
DSASLPR	Q86YV0	RASAL3	S859	-0,77	1,79E-02
LSGFSFK	P29966	MARCKS	S170	-0,84	1,59E-02
SPLFIFMR	O43521	BCL2L11	S77	-1,26	3,04E-03

Tabelle 12-6: Modifiziertes XML-Skript in ptmRS zum Nachweis von pHis. ptmRS kann in der Software Proteome Discoverer zu der Datenbanksuche hinzugefügt werden.

pHis
<!-- The modification will be used for the search by ptmRS-->
<!-- Name XML: ptmRSConf_pHis vom 25.2.2015-->
<modification name="Phosphorylation" abbreviation="Phos" searchdefined="FALSE" mass="79.96633">
<!-- Specify the targets for the modification current modification -->
<target aminoacid="S"/>
<target aminoacid="T"/>
<target aminoacid="Y"/>
<target aminoacid="H"/>
<!--
Specify neutral losses. This NL will be used while scoring. Also NLs defined by the search engine will be used. Each <target /> specifies a amino acid/numberofmodifications pair where this NL is possible
-->
<neutralloss abbreviation="-HPO3" mass="79.96633">
<target aminoacid="H"/>
<target aminoacid="Y"/>
</neutralloss>
<neutralloss abbreviation="-H3PO4" mass="97.97689">

<target aminoacid="H"/>
<target aminoacid="S"/>
<target aminoacid="T"/>
</neutralloss>
<!-- For this diagnostic ions a peak depth of 16 is used -->
<diagnosticion name="DI HCD" mass="190.0366" peakdepth="16">
<Evidence_Target>H</Evidence_Target>
<Relativity>ImoniumIon</Relativity>
</diagnosticion>
<!-- A modification with this name is matched to the upper definition -->
<equivalentmodification name="Phosphorylation" factor="1"/>
</modification>

Tabelle 12-7: Indirekt mittels SCX identifizierte, potentielle pHis-Sequenzen aus *E. coli*. Die gelisteten Histidin-haltigen Peptide wurden lediglich in den Positivkontrollen identifiziert. Der *Mascot Ion Score I* bzw. *II* entspricht dem Ergebnis der Datenbanksuche von Replik I bzw. II.

Peptidsequenz	PSMs	Protein Acc.	Proteinname	Ion Score I	Ion Score II
HTEALGELTR	3	P00864	Phosphoenolpyruvate carboxylase (ppc)	49	39
HTIMVANLAPR	2	P00959	Methionine--tRNA ligase		32
HDGEAEDVAVALNEQYQPR	2	P00961	Glycine--tRNA ligase beta subunit	47	61
HAVTEASPMVK	5	P02358	30S ribosomal protein S6	54	62
GFGVPTLIAVHPENDPK	4	P05793	Ketol-acid reductoisomerase (ilvC)	52	
HYDYIAIGGGSGGIASINR	3	P06715	Glutathione reductase	57	66
HMGWTEAADLIVK	16	P08200	Isocitrate dehydrogenase [NADP]		49
MSHLAELVASAK	6	P08312	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	51	
TSHTSIMAR*	15	P08839	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase (ptsI)	40	39
HQPDVIGLQETK	2	P09030	Exodeoxyribonuclease III		70
HVLIIGGGDGAMLR	3	P09158	Polyamine aminopropyltransferase	42	66
HNIVAIADIDTR	5	P0A6F1	Carbamoyl-phosphate synthase small chain	44	80
HLDALVADEDLSR	6	P0A6H5	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU	73	78
HNISFAEVESK	2	P0A6J8	D-alanine--D-alanine ligase A	53	66
HDLAVEPPAPTVLQK	2	P0A6K6	Phosphopentomutase	29	30
HASDDEPFSALAFK	2	P0A6M8	Elongation factor G (fusA)		33
MDQFECINVADAHQK	2	P0A6V5	Thiosulfate sulfurtransferase GlpE	33	39
HLVSPADALPGR	6	P0A744	Peptide methionine sulfoxide reductase (msrA)	45	55
HIISINDLSR	6	P0A786	Aspartate carbamoyltransferase catalytic chain	49	70
HNIDGVIATNTTLDR	2	P0A7E1	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	32	70
HNGAPAFSPDGSK	2	P0A855	Protein TolB		79
HLVDLYQQQGVK	2	P0A867	Transaldolase A	56	22
HNVAPIFICPPNADDDLLR	2	P0A877	Tryptophan synthase alpha chain	59	56
HVDSLITIPNDK	6	P0A9A6	Cell division protein (ftsZ)	50	72

VINDNFGIIEGLMTTVHATTA TQK	5	P0A9B2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A (gapA)	50	
VLDLIAHISK	2	P0A9B2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A (gapA)	45	
HTVEVMIPEAEIK	2	P0A9M2	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	30	
HLNATIINEGDINTR	2	P0A9M8	Phosphate acetyltransferase (pta)	23	59
HNGEIVPLDDIMLR	2	P0ABB8	Magnesium-transporting ATPase, P- type 1	30	
HEDFPYQEILLTR	2	P0ACR9	Transcriptional repressor MprA	18	36
HESGVVTDTPQTVLPTTLR	2	P0ADG7	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	34	56
HILIAVDLSPESK	14	P0AED0	Universal stress protein A	94	87
FDGFVHSIGFAPGDQLDGDYV NAVTR	2	P0AEK4	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] FabI	72	
SDNDELQQIAHLR	2	P0AFI7	Pyridoxine/pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	55	43
MGHAGAIAGGK*	19	P0AGE9	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha (sucD)	111	106
HANPCGVAIGNSILDAYDR	3	P15639	Bifunctional purine biosynthesis protein PurH	80	34
HFTDEPISEAQR	4	P17117	Oxygen-insensitive NADPH nitroreductase	47	63
HNDFDLNWIPVDSIER	3	P17315	Colicin I receptor	43	32
HVAILGDLQGPK	5	P21599	Pyruvate kinase II (pykA)	57	70
GGRTCHAAIAR*	4	P23538	Phosphoenolpyruvate synthase (pps)	31	21
TCHAAIAR*	5	P23538	Phosphoenolpyruvate synthase (pps)	46	29
TILNHTLGFPR	4	P25665	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-- homocysteine methyltransferase	39	32
DHLDDPVIGELR	2	P33599	NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D		33
DGAANSHAAIMVR*	2	P37177	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase (ptsP)	54	
GICLSAGSPVSHSALIAR*	2	P37349	PTS-dependent dihydroxyacetone kinase, phosphotransferase subunit (dhaM)	66	20
HDDDGVTIETADGEYQAK	2	P40874	N-methyl-L-tryptophan oxidase	21	45
SHVELQPGDFDQAGK	2	P45395	Arabinose 5-phosphate isomerase (kdsD)	49	39
HVMVSTGTSDADFEK	7	P60560	GMP reductase	74	132
MGSTGIGNGAIIPHGK*	3	P69829	Nitrogen regulatory protein (ptsN)	46	15

* = Sequenzen mit pHis Phosphorylierungsstellen, die in der Datenbank UniProt aufgeführt sind

Tabelle 12-8: Konsensussequenz-basierte Vorhersage von Kinasen, deren Substrate nach Ibrutinibzugabe differenziell vorlagen. Die Daten wurden mittels der Software NetworKIN (Score ≥ 2) generiert.

Accession	Genname	pSite	pot. Kinase	Accession	Genname	pSite	pot. Kinase
Q15691	MAPRE1	S165	CaMKIIalpha	Q7L7X3	TAOK1	S445	MAP2K3
Q13557	CAMK2D	T287	CaMKIIdelta	Q9Y463	DYRK1B	Y273	MAP2K3
P05455	SSB	S92	CDK1	Q13541	EIF4EBP1	T70	MAPK1
P11171	EPB41	S85	CDK1	Q6JBY9	RCSD1	S108	MAPK13
P16949	STMN1	S25	CDK1	Q6JBY9	RCSD1	S216	MAPK13
P16949	STMN1	S38	CDK1	Q13541	EIF4EBP1	S65	MAPK13

Q6VY07	PACS1	T504	CDK1	Q6JBY9	RCSD1	S120	MAPK13
Q9BZB8	CPEB1	S208	CDK1	Q6JBY9	RCSD1	S127	MAPK13
Q9Y6A5	TACC3	S317	CDK1	O43521	BCL2L11	S77	MAPK9
P16949	STMN1	S25	CDK1	P06239	LCK	T499	MAPK9
O00716	E2F3	S166	CDK2	P16949	STMN1	S63	PAK1
P62191	PSMC1	T434	CDK2	Q13153	PAK1	S139	PAK1
Q09472	EP300	T1906	CDK2	P16949	STMN1	S16	PAK1
Q09472	EP300	T1909	CDK2	Q04637	EIF4G1	S1209	PAK2
P07900	HSP90AA1	S231	CDK4	Q13177	PAK2	S20	PAK2
O43491	EPB41L2	S715	CDK5	Q13177	PAK2	S55	PAK2
P07910	HNRNPC	S241	CK1alpha	Q13233	MAP3K1	S10	PAK2
P08670	VIM	S412	CK1alpha	P46100	ATRX	S706	PAK3
P13807	GYS1	S652	CK1alpha	Q13153	PAK1	S144	PDHK1
Q9NRL3	STRN4	S276	CK1delta	P83916	CBX1	S89	Pim1
P11387	TOP1	S111	CK2alpha	Q9H714	KIAA0226L	S190	Pim1
O75822	EIF3J	S127	CK2alpha	P13224	GP1BB	S191	PKAalpha
P16949	STMN1	S46	CK2alpha	P52565	ARHGDI A	S34	PKAbeta
P23588	EIF4B	S498	CK2alpha	P08238	HSP90AB1	S226	PKBalph a
Q14005	IL16	S776	CK2alpha	P78527	PRKDC	S893	PKBalph a
Q14978	NOLC1	S643	CK2alpha	Q92945	KHSRP	S193	PKBalph a
Q13547	HDAC1	S421	CK2alpha	Q09666	AHNAK	S5780	PKBalph a
Q13547	HDAC1	S423	CK2alpha	Q09666	AHNAK	S5782	PKBalph a
P13807	GYS1	S657	CK2alpha	P29966	MARCKS	S170	PKCalph a
P18583	SON	S2238	CLK1	O43290	SART1	S348	PKCbeta
Q13427	PPIG	S397	CLK1	O43598	DNPH1	S123	PKCbeta
Q13427	PPIG	S442	CLK1	O95466	FMNL1	S1059	PKCbeta
Q9NYF8	BCLAF1	S183	CLK1	P04233	CD74	S8	PKCbeta
Q9NYF8	BCLAF1	S564	CLK1	P33241	LSP1	S204	PKCbeta
Q13247	SRSF6	S291	CLK1	P52566	ARHGDIB	S44	PKCbeta
Q13247	SRSF6	S293	CLK1	P62906	RPL10A	S50	PKCbeta
Q8N2M8	CLASRP	S294	CLK4	P78325	ADAM8	S683	PKCbeta
Q8TF01	PNISR	S726	CLK4	Q13428	TCOF1	S849	PKCbeta
P43405	SYK	Y364	CRK	Q14151	SAFB2	S613	PKCbeta
P46940	IQGAP1	Y172	CRK	Q6DN90	IQSEC1	S89	PKCbeta
P51149	RAB7A	Y183	CRK	Q6ZUJ8	PIK3AP1	S656	PKCbeta
P61978	HNRNPK	Y380	CRK	Q86YV0	RASAL3	S859	PKCbeta
Q13422	IKZF1	Y435	CRK	Q8IX12	CCAR1	S908	PKCbeta
Q9UJU6	DBNL	Y162	CRK	Q99623	PHB2	S286	PKCbeta
P13796	LCP1	Y28	CSF1R	Q9UIQ6	LNPEP	S91	PKCiota
P42575	CASP2	S157	DNAPK	Q9Y4G8	RAPGEF2	S960	PKCiota
Q14686	NCOA6	S1481	DNAPK	Q9BZL6	PRKD2	S214	PKD2
P06748	NPM1	S88	EIF2AK2	P55072	VCP	Y644	PTPN22
P14317	HCLS1	Y198	Fgr	P19105	MYL12A	T134	ROCK2
Q02952	AKAP12	T285	GRK2	Q01082	SPTBN1	S446	TGFbR2
O00429	DNM1L	S529	GSK3beta	P49795	RGS19	Y202	TRKA
P46100	ATRX	S889	HIPK2	O43768	ENSA	S109	TTK
Q9BXL7	CARD11	S886	HIPK2	P48730	CSNK1D	T329	TTK
P09496	CLTA	S105	ICK	Q16666	IFI16	T111	TTK
Q01201	RELB	S573	IKKalpha	Q7Z5R6	APBB1IP	T534	TTK
P07948	LYN	Y32	Kit	Q96BY6	DOCK10	T1440	TTK
P29350	PTPN6	Y564	Lyn (UniProt)				

Tabelle 12-9: Stabil-Isotopen markierte Peptide zur Validierung der SCX-Strategie zum indirekten pHis-Nachweis. Die „schweren“ Peptide mit Lys weisen einen Massenshift von 8 Da, die mit Arg einen Shift von 10 Da im Vergleich zu den endogenen, „leichten“ Peptiden auf.

Peptid-ID	Peptidsequenz
948	ADYADSLTENGTHGSDSVESAAR
946	DAGYTAVISHR
919	DASGTINVDIDHK
924	DDVAELHK
940	DEVIDHLGTIAK
923	DGYTFVSHQQEVGTGYFDK
926	DHAPLMQEINQTGGYNDEIEGK
937	DLEHPIEVPVGK
928	DQYDLHPVYK
930	DSVTLVHK
927	DTLHLEGK
936	DVADVHDIK
939	DYTLDIHDENGK
934	EGNDFYHEMTDSNVIDK
950	EILTNDISDNSGLGQHTTAAAR
947	HADNTLTFGPR
933	HDVEVLK
918	HFSTTPAEK
922	HNDGLDYVPTDK
943	HSVELDSQGR
935	LAEEIYGPEHVSTGASNDIK
931	LMEIAQQQHAQQQTAGADASANNAK
925	MGHAGAIAGGK
941	NGLHVR
921	STSDDIHNTTATGK
949	TCHAAIAR
942	TFEVLATNGDTHLGGEDFDSR
944	TGLEAAPHLTCIDATPDELK
945	TSHTSIMAR
932	VLESAIANAHEHNDGADIDDLK
938	VNEIETYMDGVHLCITAK
929	VTLDATATYVPIDDDHK