

Elution von intakten Proteoformen von magnetischen Partikeln kombiniert mit digitaler Mikrofluidik für die quantitative Top-down-Nanoproteomik von einzelnen *C. elegans*-Nematoden

Jan Leipert, Philipp T. Kaulich, Max K. Steinbach, Britta Steer, Konrad Winkels, Christine Blurton, Matthias Leippe, und Andreas Tholey*

Abstract: Während die meisten Ansätze zur Analyse von geringen Probemengen durch Nanoproteomik auf der *bottom-up*-Strategie basieren, sind *top-down*-Ansätze zur Charakterisierung von Proteoformen nach wie vor unterrepräsentiert. An Proteomen von Säugerzellen haben wir eine einfache Probenvorbereitungsmethode etabliert, welche auf Proteinaggregation an magnetischen Partikeln und anschließender Elution intakter Proteoformen durch 40 %ige Ameisensäure basiert. Die Implementierung der Methode auf einer Plattform für digitale Mikrofluidik ermöglichte die sensitive Analyse von einzelnen Individuen des Nematoden *Caenorhabditis elegans*. Die Anzahl identifizierter Proteoformen konnte dabei im Vergleich zu herkömmlicher Probenvorbereitung in einem Reaktionsgefäß um 46 % erhöht werden. Ferner erlaubte die markierungsfreie (*label-free*) Quantifizierung von Proteomen einzelner Nematoden, welche unter verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden, Änderungen der Abundanz von Proteoformen zu erkennen, welche in *bottom-up*-Experimenten nicht festgestellt wurden. Die hier präsentierte Methode wird die Proteoform-zentrische Analytik in Proben mit limitierter Verfügbarkeit vereinfachen.

Technologische Entwicklungen zur Miniaturisierung von Plattformen für die Probenvorbereitung haben in der jüngeren Vergangenheit Nanoproteomikanalysen mit sehr geringen Mengen an biologischem Material ermöglicht.^[1] Obwohl

hier beachtliche Fortschritte erzielt werden konnten, z.B. bei der markierungsfreien (*label-free*) Proteomik weniger oder sogar einzelner Zellen,^[2-4] folgten diese Bestrebungen zum Großteil dem Prinzip der *bottom-up*-*(BU)* Proteomik. Bei dieser werden Proteine zu Peptiden verdaut, welche anschließend mittels LC-MS analysiert werden. Aus diesen Informationen werden mittels bioinformatischer Methoden Rückschlüsse auf die ursprünglichen Proteine gezogen. In der *top-down*-*(TD)* Proteomik werden die Proteine nicht verdaut, sondern intakt analysiert. Obwohl technisch anspruchsvoller, bietet die TD-Proteomik mehrere Vorteile. Im Gegensatz zur *BU*-Proteomik erlaubt die TD-Proteomik die Identifizierung intakter Proteoformen.^[5] Dies liefert direkte Informationen über posttranskriptionale Modifikationen, N- und/oder C-terminal verkürzte Proteoformen und *splice*-Varianten oder Isoformen.^[6-8] Allerdings ist die TD-Analytik durch eine inhärente deutlich verringerte Empfindlichkeit charakterisiert.^[9] Typische TD-Ansätze erfordern daher noch immer relativ große Probenmengen^[10] und spezialisierte Probenvorbereitungsschritte, und Berichte über TD-Nanoproteomik sind derzeit noch selten. Beispielsweise ermöglichte eine auf der nanoPOTS-Methode basierende TD-Probenvorbereitung die Identifizierung von bis zu 620 Proteoformen aus 770 HeLa-Zellen sowie die Quantifizierung von Proteoformen aus Gewebeabschnitten.^[11,12] Ein noch neueres Beispiel ist die TD-Proteomik einzelner Zellen durch CE-MS/MS, wobei die Zellen innerhalb der Kapillare lysiert wurden.^[13]

Die Ein-Topf-Festphasen-unterstützte Probenvorbereitung (*single-pot solid phase-enhanced sample preparation*, SP3)^[14] ist eine vielseitige Methode zur Durchführung der kompletten Probenvorbereitung in nur einem einzigen Gefäß und wurde in den letzten Jahren für verschiedene Probenarten und Anwendungen in der *BU*-Proteomik eingesetzt.^[15] Das Prinzip von SP3 basiert auf der nicht-kovalenten Aggregation von Proteomen an magnetische Partikel (*beads*). Durch Waschschritte mit organischen Lösungsmitteln können Salze, Detergenzien und andere Kontaminanten effizient entfernt werden, bevor die Proteine proteolytisch verdaut und die entstehenden Peptide in den Überstand freigesetzt werden. Dadurch ist SP3 für die Analyse von geringen Probenmengen mittels *BU*-Proteomik gut geeignet,^[16] insbesondere auch in Kombination mit der digitalen Mikrofluidik (DMF).^[17,18] Intakte Proteine binden sehr stabil an SP3-*beads*, weshalb für die effiziente Rückgewinnung der Proteine Detergenzien (oder Gemische von Detergenzien)

[*] J. Leipert, P. T. Kaulich, M. K. Steinbach, B. Steer, K. Winkels, Dr. A. Tholey
Systematische Proteomforschung & Bioanalytik, Institut für Experimentelle Medizin, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
24105 Kiel (Deutschland)
E-mail: a.tholey@iem.uni-kiel.de

C. Blurton, Dr. M. Leippe
Vergleichende Immunbiologie, Zoologisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
24118 Kiel (Deutschland)

© 2023 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial License, die eine Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird.

benötigt werden.^[15] Obwohl bereits Methoden für die Elution intakter Proteine von SP3-*beads* durch LC-MS-kompatible Reagenzien entwickelt wurden,^[19,20] existiert unseres Wissens derzeit noch kein Protokoll für SP3-TD-Analysen von Proben mit geringen Proteinmengen, insbesondere nicht in Kombination mit DMF.

Zur Probenvorbereitung für die TD-Nanoproteomik haben wir daher zunächst die Elution intakter Proteine von SP3-*beads* mit nano-LC-MS kompatiblen Reagenzien getestet. Dafür wurden Lysate von Jurkat T-Zellen mit SP3-*beads* und organischen Lösungsmitteln gemischt, um die Aggregation von Proteinen an den *beads* zu initiieren. Anschließend wurden verschiedene LC-MS-kompatible Detergenzien oder flüchtige Chemikalien (Table S1) dazugegeben, um die intakten Proteine von den SP3-*beads* zu eluieren. Die Vollständigkeit der Elution wurde untersucht, indem die nicht eluierten Proteine proteolytisch verdaut und anschließend mittels LC-MS analysiert wurden. Als Negativkontrolle wurde Wasser (keine Elution), als Positivkontrolle das anionische Detergens SDS (vollständige Elution) verwendet (Abbildung 1A und Figure S1A). Zuerst testeten wir das nichtionische Detergens Dodecylmaltosid (DDM), welches bereits in einer früheren TD-LC-MS-Studie für die Analyse von wenigen Zellen verwendet wurde.^[11] Allerdings konnte hier keine Elution der Proteine beobachtet werden (Figure S1B). Auch das fluorierte Lösungsmittel Hexafluoropropanol,^[21] welches für die Extraktion intakter Proteine verwendet wird, erwies sich als ineffizient (Figure S1C).

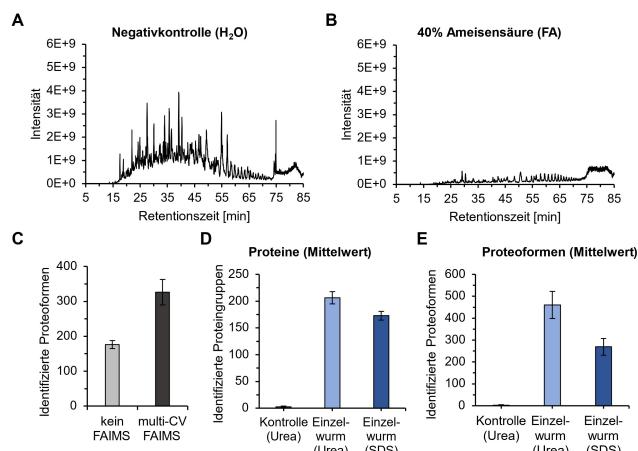


Abbildung 1. Elution intakter, auf magnetischen Partikeln aggregierter Proteine. Total-Ionenchromatogramm (TIC) eines Verdaus von Proteinen aus Jurkat T-Zellen, die nach Elution mit A) deionisiertem Wasser oder B) kalter FA (-20°C , 40%) auf den SP3-*beads* zurückblieben. C) Identifizierte Proteoformen aus Jurkat T-Zellen nach SP3-Elution (40%ige FA) der Proteine und Analyse mittels LC-MS/MS oder LC-FAIMS-MS/MS. Die jeweils injizierte Menge entspricht etwa 1000 Zellen; $n=4$. D) Durchschnittliche Anzahl identifizierter Proteingruppen und E) Proteoformen aus Leerproben oder einzelnen *C. elegans*-Nematoden, welche mit Harnstoff (Urea)- bzw. SDS-Puffer lysiert wurden, gefolgt von SP3-Elution (40%ige FA) in PCR-Reaktionsgefäß und LC-FAIMS-MS/MS-Analyse; $n=3$, Fehlerbalken: Standardabweichung.

Eine verbreitete Methode zur Solubilisierung von Proteinen ist die Verwendung von spaltbaren LC-MS-kompatiblen Detergenzien, z.B. das durch Säure spaltbare, anionische Detergens RapiGest (RG). In unserem Experiment zeigte RG ähnliche Solubilisierungseigenschaften wie SDS und eluierte die Proteine beinahe vollständig von den SP3-*beads* (Figure S1D). Allerdings führte die anschließende Ansäuerung zu einer Co-Präzipitation von Proteinen und den unlöslichen RG-Spaltprodukten,^[22] ein Effekt, den wir zuvor auch bei low-input-BU-Proteomikstudien beobachtet hatten.^[17]

Dagley et al. demonstrierten die Elution intakter Proteine von SP3-*beads* durch konzentrierte (80 %ige) Ameisensäure (*formic acid*, FA).^[19] Um eine Formylierung der Proteine zu vermeiden, wurde die Elution bei -20°C durchgeführt. Obwohl unser BU-Ansatz die früheren Ergebnisse bestätigte (Figure S1E), führt die zehnfache Verdünnung der FA-Eluate vor der LC-MS-Analyse zu hohen Volumina (300 μL im ursprünglichen Protokoll), welche für die Proteomik mit geringer Probenmenge ungeeignet sind. Wir untersuchten daher eine auf 40 % reduzierte FA-Konzentration und erzielten eine Elutionseffizienz, die sowohl mit 80 %iger FA als auch der SDS-Kontrolle vergleichbar war (Abbildung 1B).

Nachdem damit eine effektive Methode zur SP3-Elution von intakten Proteinen etabliert worden war, war es das nächste Ziel, diese Methode auf die TD-Analyse von Nanoproteomik-Proben zu übertragen. Um die Empfindlichkeit zu erhöhen, nutzten wir die Ionenmobilitätsspektrometrie mit hochfrequenter asymmetrischer Feldform (*high-field asymmetric-waveform ion mobility spectrometry* (FAIMS)) und interne stufenweise Anpassung der Kompensationsspannung (*compensation voltage*, CV), welche wir ursprünglich für die konventionelle TD-Proteomik weiter verbessert hatten.^[23] Ähnlich zu BU-Studien mit geringen Proteinmengen (und Einzelzellen),^[2] profitiert auch die TD-Nanoproteomik erheblich von der *Front-End*-Ionenfraktionierung mittels FAIMS, wie wir durch die Analyse von Proteinen aus Jurkat T-Zellen (verdünnter Präparationen von jeweils 1000 Zell-Äquivalenten) zeigen konnten (Abbildung 1C und Figure S2A). Durch den Einsatz von FAIMS wurde die Anzahl der identifizierten Proteoformen über den gesamten Massenbereich erheblich gesteigert und umfasst dabei nahezu alle Proteoformen, die auch ohne Gasphasenfraktionierung nachgewiesen wurden (Figure S2B und C).

Die Analyse von Gewebeproben und von Proben kleiner Organismen sind wichtige Ziele für die Nanoproteomik.^[24,25] Der Nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) ist ein bedeutender Modellorganismus, an welchem bahnbrechende Entdeckungen in der Entwicklungs- und der Zellbiologie gemacht wurden.^[26] Konventionelle Proteomstudien an *C. elegans* werden typischerweise mit mehreren Tausend Würmern durchgeführt, wodurch der biologische Zustand einzelner Individuen maskiert wird. Beispielsweise wurde gezeigt, dass einzelne Würmer unterschiedlich auf Umweltreize reagieren können.^[27] Durch die Charakterisierung von einzelnen Individuen auf Proteoformebene (möglicherweise auch in Kombination mit Morphologie, Verhalten und Epigenetik), kann beispielsweise die Heterogenität inner-

halb einer Population erforscht werden. Dazu sind robuste Methoden für die Probenvorbereitung erforderlich. In vorhergehenden Arbeiten zeigten wir, dass die Cuticula der Würmer nicht durch milde, MS-kompatible Detergenzen aufgelöst wird.^[25] Außerdem kann die Behandlung mit säurehaltigen Puffern in einem einzigen Reaktionsgefäß zum Zurückbleiben von Zell- oder Gewebetrümmern führen, welche bei nachfolgenden LC-MS-Analysen zu Problemen wie dem Verstopfen der Säule führen kann. Um die Eignung der FA-basierten TD-SP3-Elution intakter Proteine zu untersuchen, lysierten wir in PCR-Gefäßen einzelne adulte Nematoden, welche aus einer unveränderlichen Anzahl von 959 somatischen Zellen bestehen, mit Hilfe von Lysecocktails, die Harnstoff/NP-40 oder SDS enthielten. Die Lysate wurden mittels des SP3-Protokolls gereinigt und die auf den SP3-beads aggregierten Proteoformen mit kalter (-20°C) FA (40 %ig) eluiert. In der anschließenden TD-LC-FAIMS-MS/MS-Analyse auf einem Orbitrap-Fusion-Lumos-Tribrid-Massenspektrometer wurden 269 ± 39 ($n=3$, SDS) und 461 ± 62 ($n=3$, Harnstoff) Proteoformen (von 173 ± 8 bzw. 206 ± 12 Proteingruppen) aus einzelnen Nematoden identifiziert (Figure S3). Bemerkenswerterweise wurde keine signifikante Formylierung der mit 40 %iger FA eluierten Proteine beobachtet (Figure S4A und B).

Die Miniaturisierung der SP3-Prozedur ist durch das manuelle Pipettieren limitiert, welches Volumina von etwa 3–10 μL erfordert, um eine reproduzierbare Handhabung der *beads* und damit der analytischen Ergebnisse zu gewährleisten.^[15] Die Verringerung der verwendeten Volumina gilt jedoch allgemein als ein empfindlichkeitsbestimmender Faktor in der Nanoproteomik.^[1] Um die TD-SP3-Methode weiter zu miniaturisieren, testeten wir die Methode auf einer Plattform für die Manipulation kleiner Flüssigkeitsvolumina, der DMF.^[28] Diese “*Lab-on-a-chip*”-Technologie ermöglicht eine digital kontrollierte Manipulation von Lösungsmitteltröpfchen auf einem Array aus hydrophob beschichteten Elektroden (Abbildung 2 und Figure S5).

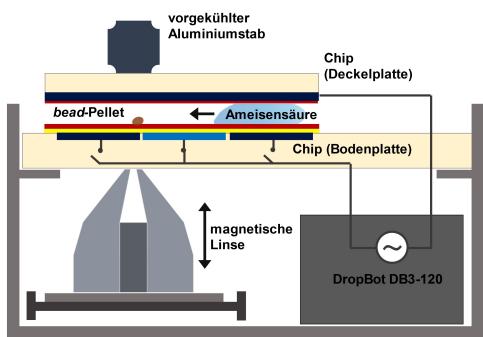


Abbildung 2. Digitale Mikrofluidikplattform für die TD-SP3-Elution intakter Proteine. Gezeigt ist ein Chip mit Elektrodenmuster auf der Bodenplatte, auf welches ein isolierendes Dielektrikum (gelb) und eine hydrophobe Schicht (rot) aufgebracht wurde.^[29,30] Tropfen (z.B. Proben, Lysepuffer, Ameisensäure) werden verschoben, indem eine Spannung an eine angrenzende Elektrode angelegt wird, während die Deckplatte auf Erde liegt. Um SP3-beads zu pelletieren, wird eine magnetische Linse benutzt. Wenn Ameisensäure über den Chip bewegt wird, wird die Deckplatte passiv mit einem Aluminiumstab gekühlt.

Durch das gezielte Anlegen einer Spannung an ausgewählte Chip-Elektroden können nano- bis mikrolitergroße Tröpfchen durch die Elektrobenetzungskraft bzw. Aktorkraft (*electrowetting force*) bewegt, aufgespalten oder zusammengeführt werden.^[29,31] In einer früheren Studie haben wir die Anwendung von magnetischen SP3-beads auf einem kommerziell verfügbaren DMF-System etabliert,^[30] wodurch wir im Vergleich zu einer SP3-Prozedur in herkömmlichen Reaktionsgefäßchen eine höhere Sensitivität und eine verbesserte Quantifizierung bei *low-input*-BU-Proteomanalysen erzielen konnten.^[17,18,25] Während SP3-aggregierte Proteine effektiv durch FA eluiert werden, erfordert DMF die Gegenwart eines passivierenden Detergents, um die Mobilität proteinhaltiger Tropfen zu gewährleisten. Nichtionische Maltosiddetergenzen mit langen Alkylketten sind bereits in der *low-input*-Proteomik^[2] und auch in DMF-Anwendungen verwendet worden,^[18] da sie von stationären Phasen auf C₁₈-Basis für Umkehrphasen (*reversed-phase*, RP)-HPLC hinreichend spät eluieren und daher mit BU-Analysen kompatibel sind. Hier haben wir die Retention von acht verschiedenen Detergenzen auf einer C₄-RP-nano-LC-Säule verglichen (Figure S6, Table S2 und Hintergrundinformationen Discussion). Nichtionisches DDM eluierte während des Trenngradianten und stört daher möglicherweise die Detektion von Proteoformen. Im Gegensatz dazu eluierte PerGlu-bisdodecylmannitol (MNA-C12), ein neuartiges mannosubstituiertes Amphiphil,^[32] erst im Waschschritt mit einem hohen Anteil an organischem Lösungsmittel im Anschluss an den Trenngradianten (Figure S6 und Abbildung 3A). Da dieses nichtionische Detergent überdies eine ausreichende Tropfenmobilität auf dem DMF-Chip gewährleistet, beruht unsere Strategie für die miniaturisierte TD-Nanoproteomik letztendlich auf einer Proteinextraktion durch DMF-SP3, anschließende Proteinelution mit 40 %iger FA und darauffolgender Verdünnung mit einer wässrigen MNA-C12-Lösung.

Als Ausgangsproben wurden Tropfen mit einzelnen adulten *C. elegans*-Exemplaren auf einen DMF-Chip geladen. Jeder Nematode wurde anschließend durch Hinzufügen eines Tropfens Harnstoff/NP-40 Lysepuffer lysiert (kombiniertes Volumen: 2 μL). Im selben Schritt wurden extrahierte Proteine durch den Puffer beigesetztes Dithiothreitol reduziert und auf den magnetischen SP3-beads aggregiert. SP3-Bindungs- und Waschschritte wurden mithilfe einer unterhalb des Chipsubstrats installierten magnetischen Linse wie zuvor beschrieben durchgeführt (Abbildung 2).^[18,33] Für die Elution der Proteoformen wurden die *bead*-Pellets in Tropfen aus 40 %iger FA (-20°C) aufgenommen und für 15 min inkubiert. Vor der Inkubation des Chips bei -20°C wurde der Chip passiv gekühlt, wodurch eine Formylierung während der Elution mit FA effektiv verhindert wurde (Figure S4C).^[19] Proteinhaltige Eluate wurden von den SP3-beads getrennt, mit Tropfen aus MNA-C12 (0.01 Gew.-%) verdünnt, und vom Chip aspiriert.^[17] Die Analyse einzelner Würmer nach TD-DMF-SP3-Vorbereitung ermöglichte die Identifikation von 673 ± 69 ($n=3$) Proteoformen von durchschnittlich 313 ± 18 Proteingruppen (Abbildung 3B). Bemerkenswerterweise führte *on-chip*-SP3 im Vergleich zu den Harnstoff-Präparationen in Standardgefäßchen (461 ± 62) zu

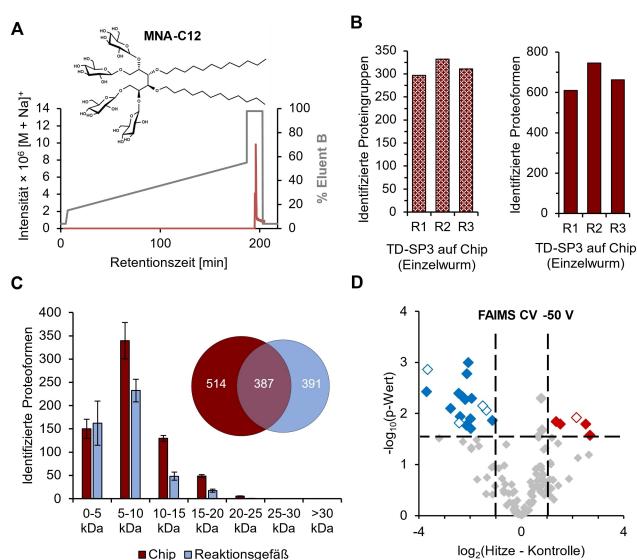


Abbildung 3. Analyse einzelner *C. elegans*-Nematoden unter Verwendung eines LC-MS-kompatiblen Detergents und DMF-SP3. A) Das extrahierte Ionenchromatogramm des nichtionischen Detergents MNA-C12 in einer Proteinprobe zeigt eine späte Elution von einer C₄-RP-Säule. B) Anzahl der identifizierten Proteingruppen und Proteoformen nach TD-DMF-SP3-Probenvorbereitung einzelner adulter Nematoden in drei Replikaten. C) Massenverteilung der Proteoformen und Überlappung einzigartiger Proteoformen (Einschub) bei Analysen einzelner adulter Nematoden nach Lyse mit Urea-Puffer auf dem DMF-Chip oder im herkömmlichen Reaktionsgefäß. D) Durch Hitze hervorgerufene Veränderungen im Proteom, basierend auf markierungsfreier Quantifizierung von Proteoformen aus einzelnen Nematoden im L4-Larvenstadium nach *On-Chip*-Extraktion (FAIMS-CV – 50 V). Blaue und rote Rauten: Proteoformen mit signifikanten Abundanzunterschieden; offene Symbole: Proteoformen des 40 S-ribosomalen Proteins S28.

einer 46 %igen Zunahme der Identifizierungen von Proteoformen (Abbildung 3C).

Als Nächstes testeten wir die TD-Prozedur für die markierungsfreie Quantifizierung (*label-free quantification*, LFQ). Nematoden wurden aus zwei unterschiedlichen Populationen von L4-Larven entnommen, von denen eine unter Hitzestress (33 °C), die andere als Kontrolle bei 20 °C kultiviert wurde.^[25] Individuelle Würmer ($n=4$ für beide Bedingungen) wurden auf dem Chip lysiert und die Proteine nach dem TD-SP3-DMF-Protokoll extrahiert. Nach der LC-FAIMS-MS/MS-Analyse wurden die Rohdaten in ihre einzelnen CVs aufgetrennt und die Quantifizierung für jede dieser CVs separat durchgeführt (Abbildung 3D, Figure S7 und Hintergrundinformationen Discussion).^[34] Insgesamt zeigten 34 Proteoformen Abundanzunterschiede (\log_2 -Grenzwert bei ± 1) zwischen hitzebehandelten Würmern und der Kontrollgruppe (Table S3). Faktoren, die die LFQ von Proteoformen speziell in Nanoproteomik-Proben erschweren, sind die limitierte Anzahl identifizierter Proteoformen und die hohe Rate fehlender Quantifizierungswerte. Aus dem letztgenannten Grund sowie aufgrund der strengen Filterung, durch welche $\approx 50\%$ der ursprünglichen Datenpunkte entfernt wurden, (Table S4), konnten einige Proteoformen nicht quantifiziert werden. So wurden beispielsweise

Proteoformen, die vier verschiedenen Hitzeschockproteinen zugeordnet wurden, ausschließlich in der Hitzestress-Gruppe gefunden (Table S5), was frühere BU-Proteomik-Daten bestätigt.^[25]

Die Mehrzahl der Proteoformen, deren Abundanz in der Hitze-Gruppe reduziert war, waren ribosomale Proteine. Fünf (von insgesamt 18 identifizierten) Proteoformen, welche dem 40S-ribosomalen Protein S28 zugeordnet wurden, zeigten eine signifikante Änderung der Abundanz (Abbildung 3D). Von diesen fünf Proteoformen waren vier N- und C-terminal verkürzt und höher abundant in der Kontrollgruppe. Dagegen war die fünfte Proteoform, die der N-terminal acetylierten kanonischen Sequenz des 40S-ribosomalen Proteins S28 entspricht, in den hitzebehandelten Würmern mehr abundant (Figure S8, Abbildung 3D). Auch in einer vorherigen BU-Proteomik-Studie mit einzelnen Würmern auf einer DMF-SP3-Plattform wurde dieses Protein identifiziert.^[25] Aufgrund der Peptid-basierten Analyse und der Tatsache, dass von den identifizierten Peptiden nur Rückschlüsse auf ein einziges kodiertes Protein gezogen werden konnte, wurde in diesem Fall die Information über die verschiedenen Proteoformen nicht erhalten (Figure S9). Dies verdeutlicht erneut den großen Vorteil der TD-Proteomik, die es ermöglicht verschiedene Proteoformen desselben Proteins mit möglicherweise unterschiedlichen biologischen Funktionen zu differenzieren und zu quantifizieren.

Wir haben hier ein einfache anzuwendendes Protokoll für die *low-input*-TD-Proteomik entwickelt, welches SP3 mit einem kostengünstigen DMF-System zur Bewegung von Flüssigkeiten kombiniert. Die Methode erwies sich als hochsensitiv und quantifizierte Abundanzunterschiede von Proteoformen einzelner Individuen eines Modellorganismus, welcher aus weniger als 1000 Zellen aufgebaut ist. Der Ansatz bietet Raum für weitere Optimierungen, wie z.B. durch eine erhebliche Verringerung der verarbeiteten Volumina mittels verkleinerter DMF-Elektroden,^[35] modifizierte Lysebedingungen und verbesserte Trennung der Proteoformen. Insbesondere könnte durch die Entwicklung und Verfügbarkeit größerer Elektrodenarrays eine automatisierte DMF-SP3-basierte TD-Nanoproteomik mit hohem Durchsatz möglich werden.^[36] Das entwickelte Protokoll besitzt auch das Potential durch die TD-Proteomanalyse von wenigen, oder sogar einzelnen Säugerzellen, zelltypspezifische Unterschiede der Proteomzusammensetzung auf Proteoformebene aufzuklären.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Exzellenzclusters "Precision Medicine in Inflammation, RTF-V", und des SFB 1182/Z3 finanziert. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Die Daten, die die Ergebnisse dieser Studie unterstützen, sind in Pride/ProteomeXchange unter <https://www.ebi.ac.uk/pride/>, Referenznummer PXD39883, frei zugänglich.

Stichwörter: Ionenmobilität · Massenspektrometrie · Mikrofluidik · Proteoformen · Proteomik

- [1] Y. Zhu, P. D. Piehowski, R. T. Kelly, W.-J. Qian, *Expert Rev. Proteomics* **2018**, *15*, 865–871.
- [2] Y. Cong, K. Motamedchaboki, S. A. Misal, Y. Liang, A. J. Guise, T. Truong, R. Huguet, E. D. Plowey, Y. Zhu, D. Lopez-Ferrer, R. T. Kelly, *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 1001–1006.
- [3] B. Budnik, E. Levy, G. Harmange, N. Slavov, *GenomeBiology* **2018**, *19*, 161.
- [4] C. Lombard-Banek, S. A. Moody, P. Nemes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 2454–2458.
- [5] L. M. Smith, N. L. Kelleher, *Nat. Methods* **2013**, *10*, 186–187.
- [6] R. D. Melani, V. R. Gerbasi, L. C. Anderson, J. W. Sikora, T. K. Toby, J. E. Hutton, D. S. Butcher, F. Negrão, H. S. Seckler, K. Srzentić, L. Fornelli, J. M. Camarillo, R. D. LeDuc, A. J. Cesnik, E. Lundberg, J. B. Greer, R. T. Fellers, M. T. Robey, C. J. DeHart, E. Forte, C. L. Hendrickson, S. E. Abbatiello, P. M. Thomas, A. I. Kokaji, J. Levitsky, N. L. Kelleher, *Science* **2022**, *375*, 411–418.
- [7] E. N. McCool, T. Xu, W. Chen, N. C. Beller, S. M. Nolan, A. B. Hummon, X. Liu, L. Sun, *Sci. Adv.* **2022**, *8*, eabq6348.
- [8] L. M. Smith, J. N. Agar, J. Chamot-Rooke, P. O. Danis, Y. Ge, J. A. Loo, L. Paša-Tolić, Y. O. Tsybin, N. L. Kelleher, Consortium for Top-Down Proteomics, *Sci. Adv.* **2021**, *7*, eabk0734.
- [9] L. V. Schaffer, R. J. Millikin, R. M. Miller, L. C. Anderson, R. T. Fellers, Y. Ge, N. L. Kelleher, R. D. LeDuc, X. Liu, S. H. Payne, L. Sun, P. M. Thomas, T. Tucholski, Z. Wang, S. Wu, Z. Wu, D. Yu, M. R. Shortreed, L. M. Smith, *Proteomics* **2019**, *19*, 1800361.
- [10] T. K. Toby, L. Fornelli, N. L. Kelleher, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2016**, *9*, 499–519.
- [11] M. Zhou, N. Uwuguiaren, S. M. Williams, R. J. Moore, R. Zhao, D. Goodlett, I. Dapic, L. Paša-Tolić, Y. Zhu, *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 7087–7095.
- [12] Y.-C. Liao, J. M. Fulcher, D. J. Degnan, S. M. Williams, L. M. Bramer, D. Veličković, K. J. Zemaitis, M. Veličković, R. Sontag, R. J. Moore, *Mol. Cell. Proteomics* **2023**, *22*, 100491.
- [13] K. R. Johnson, Y. Gao, M. Greguš, A. R. Ivanov, *Anal. Chem.* **2022**, *94*, 14358–14367.
- [14] C. S. Hughes, S. Foehr, D. A. Garfield, E. E. Furlong, L. M. Steinmetz, J. Krijgsveld, *Mol. Syst. Biol.* **2014**, *10*, 757.
- [15] C. S. Hughes, S. Moggridge, T. Müller, P. H. Sorensen, G. B. Morin, J. Krijgsveld, *Nat. Protoc.* **2019**, *14*, 68–85.
- [16] Z. Yang, Z. Zhang, D. Chen, T. Xu, Y. Wang, L. Sun, *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 10568–10576.
- [17] J. Leipert, A. Tholey, *Lab Chip* **2019**, *19*, 3490–3498.
- [18] J. Leipert, M. K. Steinbach, A. Tholey, *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 6278–6286.
- [19] L. F. Dagley, G. Infusini, R. H. Larsen, J. J. Sandow, A. I. Webb, *J. Proteome Res.* **2019**, *18*, 2915–2924.
- [20] Z. Yang, X. Shen, D. Chen, L. Sun, *J. Proteome Res.* **2020**, *19*, 3315–3325.
- [21] J. Franck, R. Longuespee, M. Wisztorski, A. V. Remoortere, R. V. Zeijl, A. Deelder, M. Salzet, L. McDonnell, I. Fournier, *Med. Sci. Monit.* **2010**, *16*, BR293–BR299.
- [22] K. A. Brown, B. Chen, T. M. Guardado-Alvarez, Z. Lin, L. Hwang, S. Ayaz-Guner, S. Jin, Y. Ge, *Nat. Methods* **2019**, *16*, 417–420.
- [23] P. T. Kaulich, L. Cassidy, K. Winkels, A. Tholey, *Anal. Chem.* **2022**, *94*, 3600–3607.
- [24] A. M. do Canto, A. S. Vieira, A. H. B. Matos, B. S. Carvalho, B. Henning, B. A. Norwood, S. Bauer, F. Rosenow, R. Gilioli, F. Cendes, I. Lopes-Cendes, *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 4412.
- [25] M. K. Steinbach, J. Leipert, C. Blurton, M. Leippe, A. Tholey, *J. Proteome Res.* **2022**, *21*, 1986–1996.
- [26] M. Markaki, N. Tavernarakis, *Biotechnol. J.* **2010**, *5*, 1261–1276.
- [27] S. L. Rea, D. Wu, J. R. Cypser, J. W. Vaupel, T. E. Johnson, *Nat. Genet.* **2005**, *37*, 894–898.
- [28] J. Lamanna, E. Y. Scott, H. S. Edwards, M. D. Chamberlain, M. D. M. Dryden, J. Peng, B. Mair, A. Lee, C. Chan, A. A. Sklavounos, A. Heffernan, F. Abbas, C. Lam, M. E. Olson, J. Moffat, A. R. Wheeler, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 5632.
- [29] K. Choi, A. H. C. Ng, R. Fobel, A. R. Wheeler, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2012**, *5*, 413–440.
- [30] R. Fobel, C. Fobel, A. R. Wheeler, *Appl. Phys. Lett.* **2013**, *102*, 193513.
- [31] J. Peng, C. Chan, S. Zhang, A. A. Sklavounos, M. E. Olson, E. Y. Scott, Y. Hu, V. Rajesh, B. B. Li, M. Dean Chamberlain, S. Zhang, H. Peng, A. R. Wheeler, *Chem. Sci.* **2023**, *14*, 2887–2900.
- [32] H. Hussain, Y. Du, N. J. Scull, J. S. Mortensen, J. Tarrasch, H. E. Bae, C. J. Loland, B. Byrne, B. K. Kobilka, P. S. Chae, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 7068–7073.
- [33] K. Choi, A. H. C. Ng, R. Fobel, D. A. Chang-Yen, L. E. Yarnell, E. L. Pearson, C. M. Oleksak, A. T. Fischer, R. P. Luoma, J. M. Robinson, J. Audet, A. R. Wheeler, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 9638–9646.
- [34] T. Xu, X. Shen, Z. Yang, D. Chen, R. A. Lubeckyj, E. N. McCool, L. Sun, *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 15890–15898.
- [35] E. R. F. Welch, Y.-Y. Lin, A. Madison, R. B. Fair, *Biotechnol. J.* **2011**, *6*, 165–176.
- [36] J. Li, C.-J. “CJ” Kim, *Lab Chip* **2020**, *20*, 1705–1712.

Manuskript erhalten: 8. Februar 2023

Akzeptierte Fassung online: 17. April 2023

Endgültige Fassung online: 31. Mai 2023