

MASTEROPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE

FOR GRADEN MASTER I FARMASI

PNGase F som verktøy i bottom-up proteomikk

Forbedret identifisering av eksosomale glykoproteiner

Rojin Salem Hame



Avdeling for Farmasøytisk Kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

20. november 2014

PNGase F som verktøy i bottom-up proteomikk

Forbedret identifisering av eksosomale glykoproteiner

Rojin Salem Hame

Masteroppgaven ble utført ved Faggruppen for Legemiddelanalyse,

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi,

Farmasøytisk Institutt ved Universitetet i Oslo

I perioden august 2013 til november 2014

Veiledere:

Professor Léon Reubsaet, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

Førsteamanuensis Trine Grønhaug Halvorsen, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

Stipendiat Siri Hildonen, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

© Rojin Salem Hame

2014

PNGase F som verktøy i bottom-up proteomikk

Forbedret identifisering av eksosomale glykoproteiner

Rojin Salem Hame

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved avdeling for legemiddelanalyse, avdeling for farmasøytisk kjemi på farmasøytisk institutt i perioden august 2013 til november 2014 under veiledning av professor Léon Reubsaet, Førsteamanuensis Trine Grønhaug Halvorsen, og stipendiat Siri Hildonen.

Først vil jeg rette en stor takk til mine veiledere professor Léon Reubsaet og Stipendiat Siri Hildonen for god veiledning og inspirasjon gjennom oppgaven. Dere har vært til god hjelp! En takk også til Førsteamanuensis Trine Grønhaug Halvorsen for god innspill og hjelp gjennom oppgaven.

Jeg vil også rette en stor takk til alle på legemiddelanalyse - det har vært en fantastisk tid.

Tusen takk til mine fantastiske foreldre som alltid har vært tålmodige og støttet meg hele veien. Jeg takker også mannen min Millat som har støttet meg i alle disse årene. Tusen takk til alle mine åtte søsken for oppmuntring gjennom hele studiet. Sist men ikke minst vil jeg takke mine gode venner Bettol, Dlvín og Esra for alle de gode stundene vi har hatt sammen.

Oslo, november 2014

Sammendrag

Glykosylering er en type post translasjonell modifikasjon (PTM) hvor komplekse karbohydrater kovalent festes til spesifikke aminosyrer ved hjelp av enzymet glykosyltransferase. Det finnes to typer glykosyleringer, N-linked som er den mest vanlige typen og O-linked. Glykosylering av proteiner endrer strukturen, egenskapene og dermed funksjon til proteiner.

En omfattende analyse av glykosyleringsseter vil hjelpe til bedre forståelse av rollen glykoproteiner spiller under fysiologiske og patologiske forhold. Imidlertid er det fortsatt utfordring å utføre stor skala analyse av glykoproteiner på grunn av heterogeniteten til glykaner. Bestemmelse av glykoproteiner ved en bottom up strategi er utfordrende. Når glykaner er bundet til proteinet begrenses enzymenes tilgang til klipping av glykosyleringsseter. Dette vil føre til at den uklipte delen av peptidet ikke detekteres av MS. I tillegg vil glykoproteiner ha varierende masse og retensjonstid som gjør identifisering av dem krevende. For å unngå dette problemet er det hensiktsmessig å deglykosylere glykoproteiner. PNGase F er det mest brukte enzymet for N-deglykosylering av glykoproteiner.

Hovedmålet i denne oppgaven er å se om deglykosylering ved hjelp av PNGase F vil forbedre protein identifisering av standard protein blandinger, eksosom standarder og eksosomer i urin. Glykoproteinet fetuin A ble brukt som protein modell. Fetuin A blandet med 9 andre proteiner ble behandlet med PNGase F for å undersøke effekten av PNGase F. Det viste seg at PNGase F førte til flere identifiserte peptider som resulterte til både høyere score og coverage av fetuin A.

Deretter ble eksosom standardløsninger i ulike konsentrasjoner behandlet med PNGase F, dette for å deglykosylere proteiner i eksosomer. Eksosomer, som utskilles i alle kroppsvæsker, er rike på proteiner og ansett som potensielle «skattekister» for biomarkører. Resultatene viste at behandling med PNGase F førte til flere identifiserte peptider og høyere coverage for N-glykoproteiner i eksosomer.

Urin ble opprensket og anrikt for proteiner ved å benytte sentrifugekolonner med 5 kDa *cut-off*. For anrikning og isolering av eksosomer fra urin ble det benyttet to ulike nanomembran konsentratorer (100 kDa og 1000 kDa). Både urinprøve spiket med eksosom standardløsning og uspiket urinprøve ble konsentrert ved hjelp av spinnkolonnene. Prøvene ble behandlet

med PNGase F. Resultatene viste at kromatogrammer fra disse forsøkene inneholdt mange topper med høy intensitet, men veldig få proteiner ble identifisert.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	IV
Sammendrag.....	VI
Innholdsfortegnelse.....	VIII
1 Forkortelser.....	XIII
2 Innledning.....	1
2.1 Introduksjon.....	1
2.2 Hensikt med oppgaven.....	2
3 Teori.....	3
3.1 Proteomikk.....	3
3.1.1 Strategier i proteomikk.....	3
3.2 Urin og diagnostikk.....	4
3.3 Aminosyrer, peptider og proteiner.....	5
3.4 Post-translasjonell modifikasjoner.....	8
3.5 Glykosylering.....	8
3.6 Deglykosylering.....	9
3.7 Eksosomer.....	10
3.7.1 Definisjon av eksosomer.....	10
3.7.2 Isolering av eksosomer.....	11
3.7.3 Ultrafiltrering av eksosomer.....	12
3.7.4 Biogenese av eksosomer.....	12
3.7.5 Sekresjon av eksosomer.....	13
3.7.6 Interaksjon av eksosomer med målcelle.....	14
3.7.7 Funksjoner til eksosomer.....	15
3.7.8 Eksosomer i diagnose og behandling.....	15
3.8 Prøveopparbeidelse.....	16
3.8.1 Redusering og alkylering av disulfid-bindinger.....	16
3.8.2 Trypsin.....	16
3.8.3 SPE metode.....	17

3.9	Væskekromatografi	18
3.9.1	HPLC.....	19
3.10	Deteksjon	19
3.10.1	Massespektrometri	19
3.10.2	Ionekilde.....	20
3.10.3	Masseanalysator	21
3.10.4	MS/MS fragmentering av peptider.....	22
3.11	Proteinidentifisering ved hjelp av MS/MS data.....	23
4	Materialer og metoder	25
4.1	Materialer.....	25
4.1.1	Kjemikalier, proteiner og utstyr.	25
4.1.2	Tillaging av buffere og løsninger.....	30
	Tillaging av buffere.....	30
4.1.3	Tillaging av reagenser	31
4.1.4	Tillaging av proteinmikstur og enzymløsninger	31
4.1.5	SPE-løsninger.....	32
4.1.6	Mobilfaser	32
4.2	Metoder.....	33
4.2.1	Tillaging av SPE-tip	33
4.2.2	Deglykosylering, trypsinering, redusering og alkylering av 10-proteinmikstur.....	33
4.2.3	SPE-prosedyre.....	34
4.2.4	Deglykosilering, trypsinering, redusering og alkylering av eksosom standardløsning.....	34
4.2.5	Deglykosilering, trypsinering, redusering og alkylering av større mengde eksosom standardløsning.....	35
4.2.6	Isolering av eksosomer fra urin.....	36
	Bruk av 5 KDa filter.....	36
4.2.7	Bruk av 1000 KDa filter.....	37
4.2.8	Bruk av 100 kDa filter.....	38
4.3	Databaser og verktøy	38
4.3.1	Proteome Discoverer	38
4.3.2	ProteinProspector	39

4.3.3	Uniprot	39
4.4	Metoder for LC-MS analyse.....	40
4.4.1	HPLC.....	40
4.4.2	MS/MS	41
5	Resultater og diskusjon	43
5.1	Bruk av fetuin A som protein modell	43
5.1.1	N-deglykosylering bekreftelse av <i>RPTGEVYDIEIDTLETTCH</i> <i>VLDPTPLANCSVR</i>	46
5.1.2	N-deglykosylering bekreftelse av <i>KLCPDCPLLAPLNSR</i>	48
5.2	Deglykosylering av eksosom standardløsning	49
5.2.1	Deglykosylering av proteiner i eksosomer.....	50
5.2.2	Deglykosylering av et «større» mengde protein eksosomer	54
5.3	Isolering av eksosomer fra urin	62
5.3.1	Bruk av 5 kDa, 100 kDa og 1000 KDa filter	62
6	Konklusjon	69
	Litteraturliste	70
7	Apenndiks.....	74
	82
	Glutamyl aminopeptidase.....	93
	Aminopeptidase N.....	95
	Neprilysin	96
	Plasma serine protease inhibitor.....	97
	Vasorin	98
	Xaa-Pro aminopeptidase 2.....	98
	Gamma-glutamyltranspeptidase 1.....	99
	Dipeptidyl peptidase 4.....	100
	Prolactin-inducible protein.....	101
	Kininogen-1.....	102
	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1.....	102
	Polymeric immunoglobulin receptor	103
	Ig alpha-1 chain C region	104
	Angiotensin-converting enzyme	104
	Semenogelin-2.....	106

Basal cell adhesion molecule	106
Aquaporin-1	107
Uroplakin-2	107
Solute carrier family 12 member 1	108
CD9 antigen	109
Alpha-1-antitrypsin	109
Choline transporter-like protein 4 (isoform 3)	110
Aquaporin-2	111
Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA	111
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	112
Prostate stem cell antigen	112
Multidrug resistance protein 1	113
CD59 glycoprotein	113
Ammonium transporter Rh type C	114
G-protein coupled receptor family C group 5 member C	114
Transmembrane protease serine 2	115
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5	116
Integral membrane protein 2B	116
G-protein coupled receptor family C group 5 member B	117
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	117
Prostasin	118
Carboxypeptidase M	119

1 Forkortelser

ACN	Acetonitrill
AA	Amino acid (aminosyre)
CID	Collision induced dissociation (kollisjonsindusert dissosiasjon)
Da	Dalton
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTT	Dithiotreitol
ESI	Elektrosprayionisering
FA	Formic acid (maursyre)
HCl	Saltsyre
HPLC	High performance liquid chromatography
IAA	Iodoacetic acid (Jodeddiksyre)
ILV	Intraluminal vesicle
KDa	kilo Dalton
LC	Liquid chromatography (væskrokromatografi)
LTQ	Linear trap quadropole
MoL	Enhet for stoffmengde
MQ vann	Milli-Q vann (renset vann)
MVB	Multi vesicular body
MS	Massespektrometri
MS/MS	Tandem massespektrometri
m/z	masse/ladning
MWCO	Molecular weight cut-off
NaCl	Natriumklorid
PNGase F	Peptid N-glykosidase

PPM	Parts per million
Rpm	Revolutions per minute (omdreininger per minutt)
PTM	Post-translasjonelle modifikasjoner
SPE	Solid phase extraction (fast-fase ekstraksjon)
TFA	Triflouroacetic acid

2 Innledning

2.1 Introduksjon

Eksosomer er små ekstracellulære membran vesikler (30-100 nm) av endosomal opprinnelse som utskilles av de fleste celletyper. De kan isoleres fra cellekulturer eller kroppsvæsker slik som plasma, serum, urin, blod, spytt, brystmelk og cerebrospinal væske. Eksosomer har fått mye oppmerksomhet i det siste tiåret fordi de spiller en viktig rolle i både fysiologiske og patologiske prosesser i kroppen. Eksosomer inneholder en rekke proteiner som gjør dem interessante i biomarkør forskning.

Urin er en av de viktigste biologiske væsker som benyttes i proteomikk analyse. Til urin proteomikk analysen brukes ofte bottom-up metoden. Eksosomer utskilt i urin vil sannsynligvis direkte reflektere nyrens tilstand og kan være viktige markører for en rekke nyresykdommer.

Siden eksosomer har sitt opphav i endosomer, er det flere proteiner som inngår i membraner. Generelt har membranproteiner unike og viktige funksjoner i cellen på grunn av deres spesielle lokasjoner og cellulær prosesser. Membranproteiner spiller også rolle i sykdommer og er target for mange legemidler.

De fleste av proteiner i eksosomer er membranproteiner i tillegg er de glykoproteiner. Glykosylering som er en vanlig type PTM og kan være involvert ved flere fysiologiske og patologiske prosesser. Analyse av glykoproteiner kan gi viktig informasjon om rollen til disse proteinene. Samtidig er det vanskelig å analysere slike proteiner på grunn av store heterogenitet av glykaner som gjør at proteinet får andre fysikalske og kjemiske egenskaper enn ikke-glykoproteiner. Derfor er det viktig å fjerne glykaner fra proteinet før analysen.

2.2 Hensikt med oppgaven

Hovedmålet med oppgaven var å kunne få en sikrere indentifisering av proteiner i eksosomer etter behandling med PNGase F enzymet. For å nå dette målet ble følgende delmål satt:

- Undersøke effekten av PNGase F på modell proteinet fetuin A i enkelt proteinblanding
- Undersøke effekten av PNGase F på eksosomale proteiner fra ulike konsentrasjoner av eksosom standardløsning
- Undersøke effekten av PNGase F på urinproteiner av eksosomale proteiner isolert fra urin

3 Teori

3.1 Proteomikk

Proteomikk er definert som storskala studier av proteiner, deres struktur og funksjoner [1]. Den brede anvendelsen av proteomikk i forskning og klinisk medisin har bidratt til bedre forståelse av molekylære mekanismer for underliggende sykdommer. Dermed kan det oppdages nye diagnostiske sykdomsmarkører og utviklings nye legemidler [2].

Innen klinisk proteomikk er urin, serum og plasma eksempler på biologisk væsker som er nyttige for diagnostisering av ulike sykdommer. Bruk av urin som analytisk verktøy har en rekke fordeler fremfor andre biologiske væsker. Prøvetakingen er ikke-invasiv og kan lett skaffes i store mengder. Mengden og sammensetningen av urin proteomet vil direkte reflektere endringer i funksjonen av nyrene [3-5].

Massespektrometri (MS) brukes mye for analyse av biologiske væsker innenfor proteomikk forsøk [6]. Ved hjelp av MS kan tre strategier brukes for identifisering av proteiner, disse kalles *Bottom-up*, *top-down* og *middel-down* proteomikk [7]. I denne oppgaven ble det brukt en *bottom-up* metode.

3.1.1 Strategier i proteomikk

Ved en bottom-up metode proteolysers proteiner til mindre peptider. Disse peptider separeres, basert på deres fysiske og kjemiske egenskaper på en LC-kolonne for så å detekteres av et massespektrometer. For å få en vellykket bottom-up proteomikk analyse er det viktig å få klippet proteiner til peptider med kjemiske egenskaper og masser som er optimale for LC separasjon og MS deteksjon [8].

Ved top-down metoden analyseres intakte proteiner uten proteolyse av peptider. Top-down metoden har potensielle fordeler for PTM og protein isoform bestemmelse. Samtidig har denne metoden flere begrensninger sammenlignet med bottom-up metoden på grunn av vanskeligheter med protein fraksjonering, proteinionisering og fragmentering i gassfasen [9].

Fordeler med analyse av peptider ved bottom-up fremfor proteiner ved top-down analyse er at analyse på peptider gir bedre nøyaktighet. Det kan også være vanskelig å detektere store og

hydrofobe proteiner. Følsomheten på intakte proteiner er også ikke like bra som følsomheten på peptider [9, 10].

En middel-down metode er en slags «blanding» mellom bottom-up og top-down metode. Denne metoden analyserer større peptider sammenlignet med bottom-up metoden, minimerer antall «felles» peptider mellom proteiner. I tillegg vil store peptider gi lignende fordeler som top-down metoden, som for eksempel å få ytterligere innsikt i post-translasjonelle modifikasjoner [9].

3.2 Urin og diagnostikk

Analyse av urin er en av den eldste diagnostikk prosedyren. Visual inspeksjon eller «Uroscopy» av farge og egenskap til urin var en sentral del av praktisk medisin [4]. Gamle klinikere oppdaget glukose i urin ved å smake på den eller observere om urinen tiltrakk maur [11]. Tilsvarende kunne de observere albumin i urin ved den såkalte «skum test» og dermed bruke observasjonen som diagnose for nyresykdom [4, 11].

Urin er et filtrat av blod som ledes fra nyrene gjennom urinveiene, der urinen videre samles i urinblæren. Den ferdige urinen inneholder ikke viktige næringsstoffer og byggesteiner slik som glukose og store proteiner siden disse vil normalt re-absorberes fullstendig gjennom nyrene. Derimot inneholder den høye konsentrasjoner av typiske avfallsstoffer, ioner og vann [12].

Urin inneholder proteiner men vanligvis i spormengder, inntil ca. 50-150mg/dag eller 10 mg/dl [4, 11, 13]. Disse proteiner stammer fra både plasma og urinveiene. Plasma proteiner slik som albumin utgjør en tredje del av det totale protein mengden i urin, resten er globuliner. Uromodulin proteinet utskilles fra tubulære celler fra urinveiene også utgjør en tredje del av utskilte proteiner i urin [13]. Celler, eksosomer og ulike vesikler er komponenter som også utskilles via urin [11].

Reabsorpsjon av proteiner via nyrene er avhengig av størrelsen. Mer enn 99,9 % av proteiner er i størrelsesorden som albumin (66 kDa) eller større, slike store proteiner passerer ikke nyrenes glomeruli [4].

Protein utfelling, ultra sentrifugering og ultrafiltrering er eksempler på metoder som brukes for å isolere proteiner fra urin [14].

Med dagens utviklede instrumenter for proteomikk analyse er det mulig å påvise proteiner selv i veldig lave konsentrasjoner og bruke det som diagnose for en rekke sykdommer [4]. Urin proteomikk anvendes for biomarkør oppdagelse for nyresykdommer, inkludert diabetisk nevropati, IgA nevropati, lupus nefritt, renal fanconi syndrom, akutt nyresvikt og renal allograft avvisning [3].

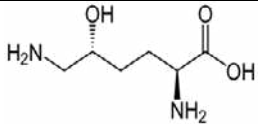
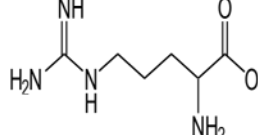
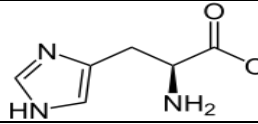
3.3 Aminosyrer, peptider og proteiner

Aminosyrer er viktige bestanddeler i alle celler. Det finnes til sammen 20 essensielle aminosyrer i proteiner. Alle aminosyrer har en aminogruppe og en karboksylsyre gruppe, som er bundet til samme karbon atom som kalles alfa karbon (α -karbon). Deres kjemiske egenskaper stammer fra sidekjeden (R gruppen) som også er bundet til α -karbonet (Tabell 1-4) [15, 16].

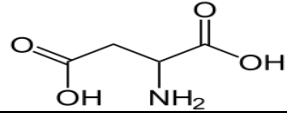
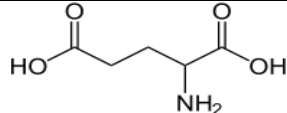
Peptider dannes når to aminosyrer kovalent bindes sammen ved en kondensasjonsreaksjon hvor vann elimineres mellom to nærliggende $-NH_2$ og $-COOH$ grupper. Uavhengig av aminosyrene som bindes sammen har alltid peptider en aminogruppe (NH_2) på den ene enden (N-terminus) og en karboksylgruppe ($COOH$), på den andre enden (C-terminus). Dette gir proteinet en definitiv retning.

Et protein er bygget opp av en eller flere kjeder med aminosyrer som deretter brettes/foldes til en tredimensjonal struktur. Denne foldingen er avgjørende for den biologiske aktiviteten til proteinet [15, 16]. Tabell 1-4 viser oversikt over de 20 aminosyrene som finnes i proteiner.

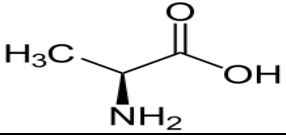
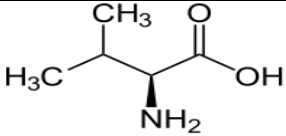
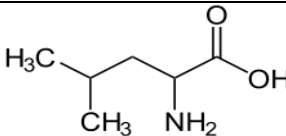
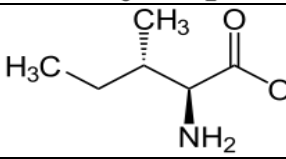
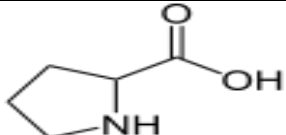
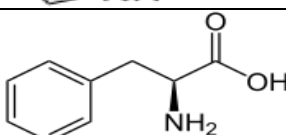
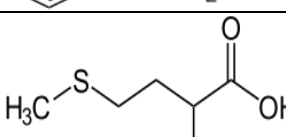
Tabell 1: Aminosyrer med basisk sidekjede

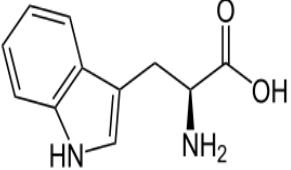
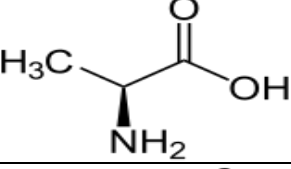
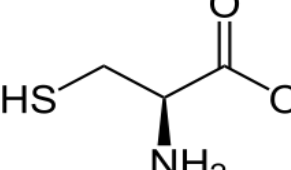
Aminosyre	Forkortelse/symbol	Forekomst i proteiner (%)*	Molar masse	Struktur
Lysin	Lys eller K	5,9	146	
Arginin	Arg eller R	5,1	174	
Histidin	His eller H	2,3	155	

Tabell 2: Aminosyrer med sur sidekjede

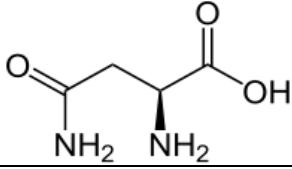
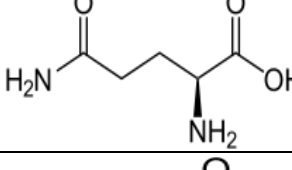
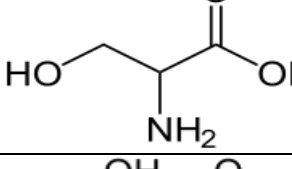
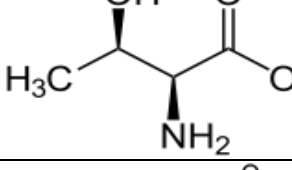
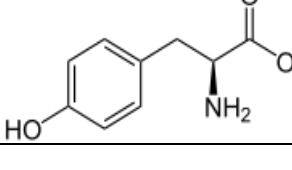
Aminosyre	Forkortelse/symbol	Forekomst i proteiner (%)*	Molar masse	Struktur
Asparaginsyre	Asp eller D	5,3	133	
Glutaminsyre	Glu eller E	6,3	147	

Tabell 3: Aminosyrer med ikke-polare sidekjeder

Aminosyre	Forkortelse/symbol	Forekomst i proteiner (%)*	Molar masse	Struktur
Alanin	Ala eller A	7,8	89	
Valin	Val eller V	6,6	117	
Leucin	Leu eller L	9,1	131	
Isoleucin	Ile eller I	5,3	131	
Prolin	Pro eller P	5,2	115	
Fenylalanin	Phe eller F	3,9	165	
Metionin	Met eller M	2,3	149	

Tryptofan	Trp eller W	1,4	204	
Glysin	Gly eller G	7,2	75	
Cystein	Cys eller C	1,9	121	

Tabell 4: Aminosyrer med uladete sidekjerder

Aminosyre	Forkortelse/symbol	Forekomst i proteiner (%)*	Molar masse	Struktur
Asparagin	Asn eller N	4,3	132	
Glutamin	Gln eller Q	4,2	146	
Serin	Ser eller S	6,8	105	
Treonin	Thr eller T	5,9	119	
Tyrosin	Tyr eller Y	3,2	181	

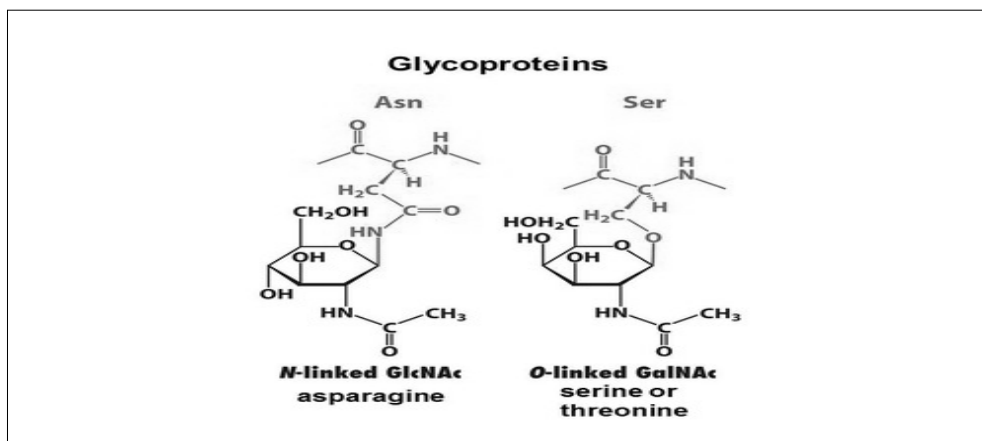
(*) gjennomsnittlig forekomst i mer enn 1,150 proteiner [16].

3.4 Post-translasjonell modifikasjoner

Post-translasjonell modifikasjoner (PTM) er kjemiske endringer (modifiseringer) som oppstår på proteinet etter at det er syntetisert. En slik endring kan være kovalent binding av en funksjonell gruppe eller karbohydrat del. PTMs av et protein kan endre funksjonen og lokasjonen av proteinet. PTMs omfatter fosforylering, glykosylering, acetylering, ubiquitinering, lipidering, proteolyse og metylering. I denne oppgaven ble det fokusert på glykosylering [17].

3.5 Glykosylering

Glykosylering er en type post translasjonell modifikasjon på proteinet hvor komplekse karbohydrater eller oligosakkarider kovalent festes til spesifikke aminosyrer. Denne prosessen er utført ved hjelp av enzymet glykosyltransferase. Det finnes to typer glykosyleringer, N-linked som er den mest vanlige typen og O-linked. Ved N-linked glykosylering er karbohydratgruppen bundet til amidgruppen på aminosyre asparagin, mens ved O-linked glykosylering er bindingen via hydroksyl gruppen på aminosyrene serin eller treonin (Figur 1) [16, 18]. Glykosylering oppstår både i endoplasmatiske retikulum (ER) og golgiapparatet [16]. Det er antatt at mer enn halvparten av proteiner er glykoproteiner [19].



Figur 1- N-linked og O-linked glykosylering.

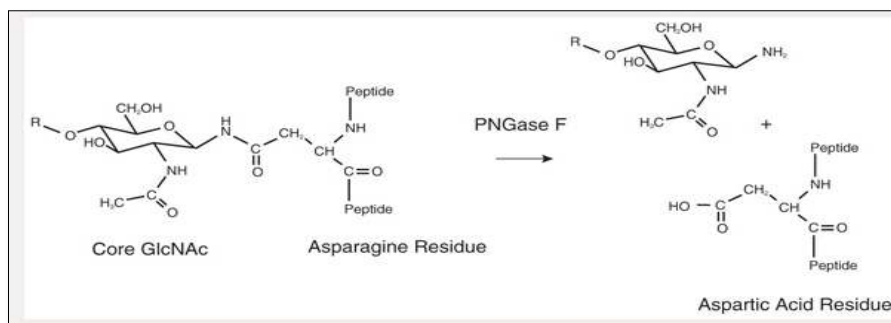
Avhengig av proteinet, har oligosakkarider på proteiner flere forskjellige funksjoner. Glykosylering av proteiner endrer strukturen, egenskapene og dermed funksjon til proteiner [20]. De kan beskytte proteiner mot degradering, holde dem tilbake i ER til det er korrekt foldet. I tillegg kan de bidra til å målstyre proteiner til riktig organ, ved å fungere som et

transportsignal og bidra til pakking av proteinet i passende transportvesikler. På celleoverflaten danner oligosakkarider en del av cellens karbohydratlag, og kan fungere i gjenkjennelsen av en celle med andre [16].

N og O-linket glykoproteiner er også involvert i utviklingsprosesser i cellen, i bakteriell binding til vertscellen, til å opprettholde normale funksjonene til celle, vev og organer [18]. Glykosylering er en svært regulert proteinmodifisering i celler og er kjent for å være involvert i utvikling av flere patologiske tilstander som kreft, neuropatologi, astma, revmatisk artritt, Alzheimers sykdom, multipel sklerose, cystisk fibrose og Crohn's syndrom [18, 21].

3.6 Deglykosylering

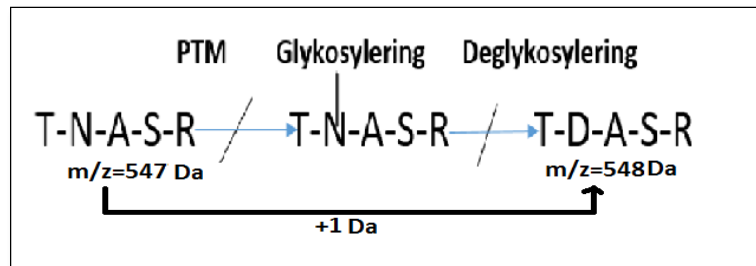
Deglykosylering er fjerning av karbohydrater fra proteinet. Det finnes både O- og N-deglykosylering, men i oppgaven ble det fokusert på N-deglykosylering. Det finnes både kjemisk og enzymatisk deglykosylering [22, 23]. Ved enzymatisk metode er peptid N-glykosida F (PNGase F) mest brukt enzym for deglykosylering av N-linked glykosylering (Figur 2). Dette enzymet deamiderer glykosylert asparagin til asparaginsyre. Konsekvensene er at deglykosylerte peptider vil få en masse økning på +984 Da i forhold til det umodifiserte peptidet. Et eksempel på dette er vist i Figur 3.



Figur 2- Enzymatisk kløyving av karbohydratdelen fra aminosyren asparagin.

En omfattende analyse av glykosyleringssteder vil hjelpe til bedre forståelse av rollen glykoproteiner spiller under fysiologiske og patologiske forhold. Imidlertid er det fortsatt utfordring å utføre stor skala analyse av glykosyleringssteder på grunn av heterogeniteten til glykaner [22]. I tillegg vil disse glykaner begrense enzymenes tilgang til klipping av

glykosyleringssteder. Dette vil føre til at den uklipte delen av peptidet ikke detekteres av MS. For å unngå dette problemet er det hensiktsmessig og deglykosylere proteiner [23].



Figur 3- Oversikt over glykosylering og deglykosylering av en aminosyresekvens.

3.7 Eksosomer

3.7.1 Definisjon av eksosomer

Begrepet «Eksosomer» ble først brukt i 1981 og 1983 ble de oppdaget ved mikroskopi. I det siste tiåret har eksosomer fått mye oppmerksomhet [24]. Eksosomer er små ekstracellulære membran vesikler (30-100 nm) av endosomal opprinnelse som utskilles av de fleste celletyper. De kan isoleres fra cellekulturer eller kroppsvæsker slik som plasma, serum, urin, blod, spytt, brystmelk og cerebrospinal væske (CSF) [24, 25]. Eksosomer er runde eller koppformet med en membran som er bygget opp av et dobbelt lipidlag [15]. Eksosomer har et lite lasterom «cargo» til å bære proteiner og andre komponenter slik som RNA og DNA. Det antas at eksosomer er unike i deres protein og lipid-sammensetning.

Siden eksosomer har sitt opphav i endosomene, er det flere proteiner som inngår i membraner. Slike proteiner er altså markører for eksosomer. Generelt har membranproteiner unike og viktige funksjoner i cellen på grunn av deres spesielle lokasjoner og cellulær prosesser [26]. I tillegg spiller de rolle i sykdommer og er target for legemidler [27]. Nesten 50 % av kjente legemidler virker på membran proteiner, og slike proteiner er fortsatt viktige target for utvikling av nye legemidler [26]. Andre komponenter som mRNA og DNA har en rekke funksjoner i forbindelse med eksosomer bland annet som biomarkør for en rekke sykdommer.

I tillegg til proteiner nevnt i Tabell 5 er det identifisert over 4400 proteiner i forbindelse med eksosomer ved hjelp av MS [24].

Tabell 5: vanlige komponente/proteiner i eksosomer

Komponenter/proteiner i eksosomer	Navn
Membran transport og fusjon proteiner	Rab GTPase, SNARE, Annexins, flotillin
Proteiner assosiert med lipid mikrodomene, slik som tetraspannins	CD9, CD37, CD63, CD53, CD81,CD82
Heat shock proteiner	Hsc70, Hsp 90
Proteiner involvert i MVB biognese	Alix, TSG101
RNA typer	mRNA og miRNA
ESCRT-kompleks	ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, og ESCRT-III
Rollen av eksosomer som antigen presenterende vesikkel [28].	MHC klasse I og II
Proteiner involvert i celle signaler og mediatorer for intracellulære signaler [29].	B-catenin, Wnt5B, Delta like 4 og TNF-a, TGF-B
Raft assosiert lipider	Kolesterol (primært B-lymfocytter), keramid, andre sfingolipider, og fosfoglyserider med lang og mettete fettsyrer
Sukkerholdige grupper på ytre delen av eksosomer	Mannose, polylactosamine, α -2, 6 sialinsyre, og komplekse N-koblede glykaner
Andre stoffer relatert til immunceller som eksosomer frigjørere til målcellen	Prostaglandiner

3.7.2 Isolering av eksosomer

Tamm-horsfall (uromodulin) og albumin er mye forekommende proteiner i urin. Derfor kan disse proteiner komplisere påvisning av mindre forekommende proteiner og eksosomer i urin. Isolering av eksosomer fra urin kan derfor minimere kompleksiteten til prøven. Eksosomer kan isoleres fra urin via ulike metoder inkludert *ultracentrifugering*, *ultrafiltrering*, *immunoaffinitet* i tillegg til andre metoder. Fordelen med *ultrasentrifugering* er at metoden ikke ødelegger strukturen til eksosomer og kan i tillegg isolere andre vesikler, men metoden er tid- og arbeidskrevende og krever dyrt utstyr. Ved *ultrafiltrering* jobber man med lite

mengde prøve etter filtrering, samt er metoden enkelt og raskt, men ulempen at kontaminerende proteiner beholdes i prøven og kvantitative mengder av proteinvesikler blir lite. *Immunoaffinitet* gjør at man får bestemte eksosomer, men bindingen er ikke spesifikk og man sjelden får 100 % opprensing av prøven [30]. I denne oppgaven ble det fokusert på ultrafiltrering metode.

3.7.3 Ultrafiltrering av eksosomer

Ultrafiltrering er separering av stoffer med høy molekylvekt fra en væske ved hjelp av nanomembranfilter. Samtidig påsettes det på trykk til å presse væsken gjennom filteret. I 2007 ble det utviklet en ultrafiltrerings metode basert på kommersielt tilgjengelige nanomembran konsentrator. Det ble isolert eksosomer fra både friske individer og pasienter med nyresykdom. Eksosom markører, slik som TSG101, AQP2, NES, Annexin V, ACE, og podocalyxin ble påvist ved hjelp av western blotting metode [31].

Kommersielt tilgjengelige nanomembran konsentratorer er produsert med en smal, veldefinert molekyl porestørrelsesfordeling og derfor de molekylære størrelses *cut-off* er forholdsvis nøyaktige. Opptil 30 % gangers konsentrasjon kan oppnås med et utbytte av targetanalytt på opptil 95 %. I denne oppgaven ble det brukt tre forskjellige nanomembran filtre, 5kDa, 100 kDa og 1000 kDa cutoff filter.

3.7.4 Biogenese av eksosomer

Dannelse av eksosomer starter ved at en del av cellens ytre membran danner en innbuktning som etter hvert avsnøres til en endocytotisk vesikkel. Slike vesikler modnes til «tidlig» endosomer og velger dermed to veier; enten transporteres de tilbake til plasmamembranen eller de modnes til «sene» endosomer (Figur 4-a) [32]. Fra «sene» endosomer invagineres og avsnøres nye vesikler kalt *Multivesicular body* (MVB). Dette fører til dannelse av intraluminal vesikler (ILV) inni MVB. Disse ILV inneholder både proteiner, lipider og mRNA [33].

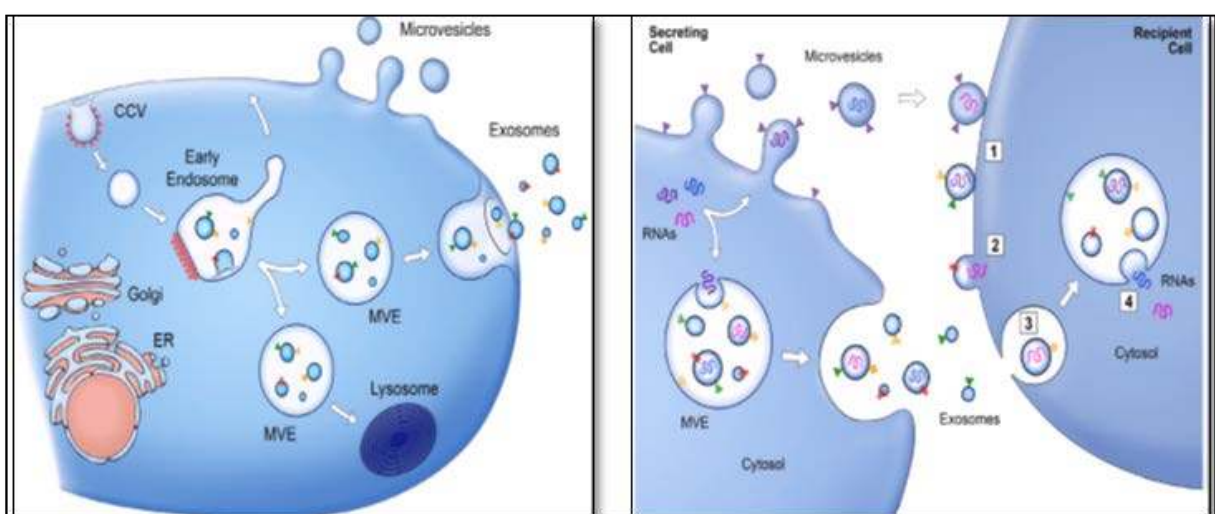
Mekanismer for hvordan proteiner sorteres i de intraluminal vesikler er ikke helt klarlagt. Det finnes to mekanismer som medierer denne prosessen; den ene via *endosomal sorting complexes required for transport* (ESCRT). Komplekset består av fire løselige multiproteiner (ESCRTs -0, -I, -II -III) hvor de sorterer valgte proteiner (*cargos*) til ILV. Denne prosessen

krever ubiquitinerings, hvor ubiquitinert *cargos* gjenkjents og bindes av ESCRT-0 komplekset og deretter passerer til siste ESCRT komplekset som formidler ILV dannelse. ESCRT-0, I og II har ubiquitinbindings domene som muliggjør passering av *cargos* mellom ESCRT-komplekset på endosomal membran [32, 34, 35].

Andre sorterings mekanismer som ikke er avhengig av ESCRT-komplekset, krever sflingolipid ceramid. Ceramid er et lipid som finnes i cellemembranen og er antatt å være assosiert i innvaginering av ILVs [36].

3.7.5 Sekresjon av eksosomer

ILV skiller ut i det ekstracellulære rom i form av eksosomer ved at MVB fusjonerer med plasmamembranen (Figur 4-a). Mekanismen bak fusjonen er ikke helt klarlagt, men noen studier tyder på at Rab GTP aser som krever funksjon av Rab 11 er ansvarlig for eksosom sekresjon. Hemming av Rab 27a, Rab27b og Rab 35 fører til betydelig reduksjon i eksosom sekresjon [32]. Det er også nevnt i noen studier at p53, et gen regulerende protein er involvert i sekresjon av eksosomer [37]. Depolarisering av plasmamembranen har vist å øke sekresjon av eksosomer fra nerveceller. Når CD3 positive celler kryssbinder med T-celle vil det føre til sekresjon av eksosomer fra T-cellene. En sentral trigger for frigjøring av eksosomer involverer økning i konsentrasjon av intracellulært Ca^{2+} [32]. Et proteinkompleks kalt SNARE-kompleks er også antatt å være involvert i fusjon av MVB med cellemembranen [32].



Figur 4- a) dannelse og utskillelse av eksosomer. b) interaksjon av eksosomer med mottaker celle [32].

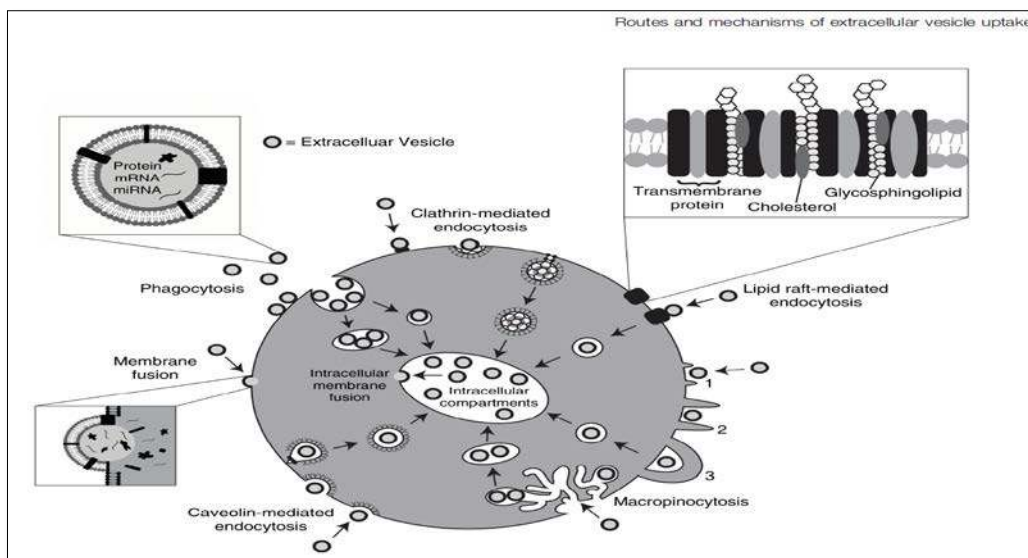
3.7.6 Interaksjon av eksosomer med målcelle

Funksjonen av eksosomer i fysiologiske og patologiske prosesser er avhengig av interaksjon mellom eksosomer og mottakercelle og overlevering av sitt «cargo» av proteiner, RNAs og lipider [38].

Eksosomer er involvert i sykdommer slik som kreft. Derfor er viktig å forstå de molekylære mekanismene for hvordan målcellen tar opp eksosomer. Det er antatt at eksosomer kan brukes som «legemiddel bærer» målrettet til kreftceller.

Figur 4-b viser at eksosomer kommuniserer med målceller via tre ulike mekanismer:

1) eksosom membranproteiner interagerer med reseptorer eller adhesjonsmolekyler på målcelle som fører til aktivering av intracellulære signaler 2) eksosommembranen fusjonerer direkte med cellens plasmamembran og resulterer i overføring av cargo (RNA og proteiner) til target celle 3) eksosomer internaliserer med target celle og dermed skjer det en fusjon av eksosom membranen med endosomal membranen [38-40]. Disse prosessene er regulert av forskjellige proteiner og proteinkomplekser, inkludert klatrin- avhengig og klatrin-uavhengig vei (caveolin-mediert opptak), makropinocytose, fagocytose og lipid raft mediert endocytose (Figur 3) [40].



Figur 5- Molekylære mekanismer for hvordan eksosomer tas opp av mottaker cellen [40].

3.7.7 Funksjoner til eksosomer

Eksosomer spiller en viktig rolle for kommunikasjon mellom celler. Siden eksosomets cargo av proteiner og RNA er innkapslet og beskyttet av proteaser og nukleaser i blodet, vil de derfor kommunisere ikke bare med nabocelle, men også med celler over avstander [24].

Eksosomer er involvert i utviklingen av nevrodegenerative sykdommer slik som Alzheimer og Parkinson sykdom ved å overføre patogener mellom celler [25].

Overføring av enkelte virus, som HIV mellom celler er rapportert til at det fører til spredning sykdommer. Eksosomer kan promotere utviklingen av tumorceller via intercellulær kommunikasjon og bidrar dermed til metastasering av tumorceller [24, 40]. I immunsystemet kan eksosomer dempe immunresponser ved å hemme naturlige drepeceller og T-lymfocytter. De kan igjen ha en stimulerende effekt på immunceller ved å presentere antigen for andre celler [24, 32]. Eksosomer kan også bære prostaglandiner og dermed være involvert i betennelses reaksjoner [24]. Eksosomer er også involvert i programmert celledød, angiognese, koagulasjon, og i morsmelken kan eksosomer modulere utvikling av barnets immunsystem [24, 41].

3.7.8 Eksosomer i diagnose og behandling

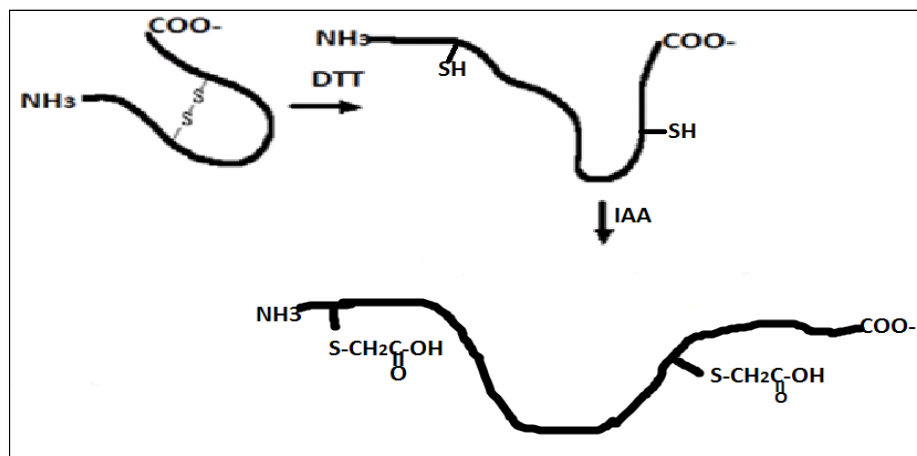
Eksosomer som nevnt er oppdaget i en rekke kroppsvæsker inkludert, urin, plasma, serum, spytt. Eksosomer kan være nyttige for tidlig diagnose av forskjellige sykdommer på grunn av deres spesifikke proteiner, RNA og lipider. I de siste årene har legemiddelindustrien utviklet flere eksosombaserte tester både for kreft og andre sykdommer [32]. Det er gjort studier på at eksosomal miRNA kan brukes som biomarkor for lungekreft [41].

Eksosomer er også benyttet terapeutisk. Det er utviklet vaksine basert på eksosomer som er i klinisk fase II forsøk [32]. Eksosomer har også blitt undersøkt for deres terapeutisk potensiale i behandling av infeksjoner slik som toksoplasmose, difteri, tuberkulose, og akutt luftveissyndrom samt autoimmune sykdommer [42]. I tillegg er det undersøkt muligheten for eksosomer til å bringe legemidler til målcellen slik som immuneceller og kreftceller [42]. Det er også foreslått at eksosomer kan være benyttet i behandling av kardiovaskulære sykdommer [43].

3.8 Prøveopparbeidelse

3.8.1 Redusering og alkylering av disulfid-bindinger

Disulfidbinding – (-S-S) er kovalent binding mellom to cysteinmolekyler i et protein dannet via oksidasjon mellom to sulfhydryl grupper (-SH) katalysert av enzymer i ER lumen. Disulfidbindinger bidrar til å stabilisere strukturen til proteiner [16].



Figur 6- Oversikt over redusering og alkyleringsprosessen av disulfid-bindinger.

Under prøveopparbeidelse er det vanlig å redusere disulfid-bindinger ved å bruke DL-Dithiothreitol (DTT). For å unngå at den reduserte –SH ikke re oksideres til S-S, må alkylering utføres. Dette kan gjøres på ulike måter og vil ha konsekvenser for massen til peptidet. Joddeddiksyre (IAA) brukes ofte som alkyleringsmiddel. Når IAA binder seg til –SH fører dette til en masse økning på 58 Da for peptidet, dette er illustrert i Figur 6.

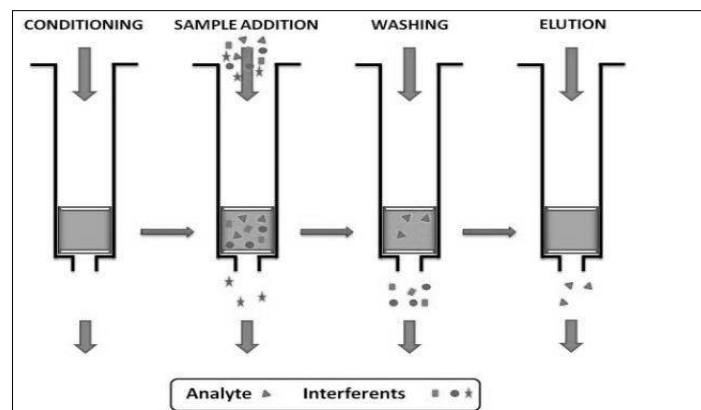
3.8.2 Trypsin

Trypsin er det blitt det mest anvendte enzymet i «bottom up» proteomisk analyse. I løpet av årene har enzymet blitt modifisert til en meget effektiv og motstandsdyktig protease mot autolyse. Enzymet er tilgjengelig i store mengder til lave kostnader og har en svært høy grad av spesifisitet. Trypsin spalter peptidbindinger på karboksylsiden av arginin og lysin, et unntak er når prolin kommer etter disse aminosyrene. Lysin og arginin er relativt hyppige aminosyrer i human proteomet, og er vanligvis godt fordelt gjennom proteinet. Dette fører til at trypsin klipper proteiner til peptider med en gjennomsnittlig lengde på ca. 7-14 aminosyrer.

Trypsinerte peptider bærer minst to positive ladninger og er dermed ideelt egnet for MS analyse. De fordelaktige egenskapene av tryptiske peptider fører til høy kvalitet MS/MS fragmentering spektra og dermed et sikrere peptid identifikasjon i protein database søk. Dette i sin tur øker sikkerheten av proteinidentitet [44]. De optimale enzymatiske forholdene for trypsin er pH 8 og en temperatur på rundt 37°C.

3.8.3 SPE metode

Fast fase ekstraksjon rens og oppkonsentrerer analytter fra prøveløsningen. I fast fase-ekstraksjon suges prøveløsningen gjennom en sorbent. Sorbenten har funksjonelle grupper på overflaten som gir interaksjon med analytten, jo sterkere denne interaksjonen er desto bedre separasjon av analytt fra væsken. Valget av sorbent er avhengig av hva slags interaksjons typer som ønskes under ekstraksjonen [45]. Omvendtfase ekstraksjon brukes mest for separasjon av peptider [8, 46]. Ekstraksjonsprosessen utføres i 4 trinn (Figur 7) [45].



Figur 7- Oversikt over SPE prosedyre (<http://www.intechopen.com/books>)

Kondisjonering

Det første trinnet, kondisjonering utføres for å aktivere funksjonelle grupper på sorbenten slik at de blir i stand til å ta imot prøven. I utgangspunktet er disse funksjonelle grupper tørre og sammenfoldet på overflaten. Ved å fukte sorbenten vil de funksjonelle gruppene reise seg opp, overflatearealet økes og prøveløsningen får god kontakt med den aktive overflaten.

Påsetting av prøveløsningen

Når prøveløsningen suges gjennom kolonnen, vil analytten fordele seg mellom den aktive overflaten og væsken. Målet er at analytten skal bli retardert av sorbenten. Det må være tilstrekkelig sterke interaksjoner mellom analytten og sorbenten for retensjon.

Vask

Når analytten er bundet til funksjonelle grupper på sorbenten er det viktig å vaske ut av kolonnen stoffer som har liten retensjon. Vaskeløsningen kan ha et elueringsstyrke som er noe sterkere enn prøveløsningen, samtidig må elueringsstyrken ikke være så høy at analytten vaskes ut.

Eluering

For eluering av analytten må alle interaksjoner med sorbenten brytes. Med hensyn til MS-analysen det er vanlig å bruke et løsemiddel som kan dampes av.

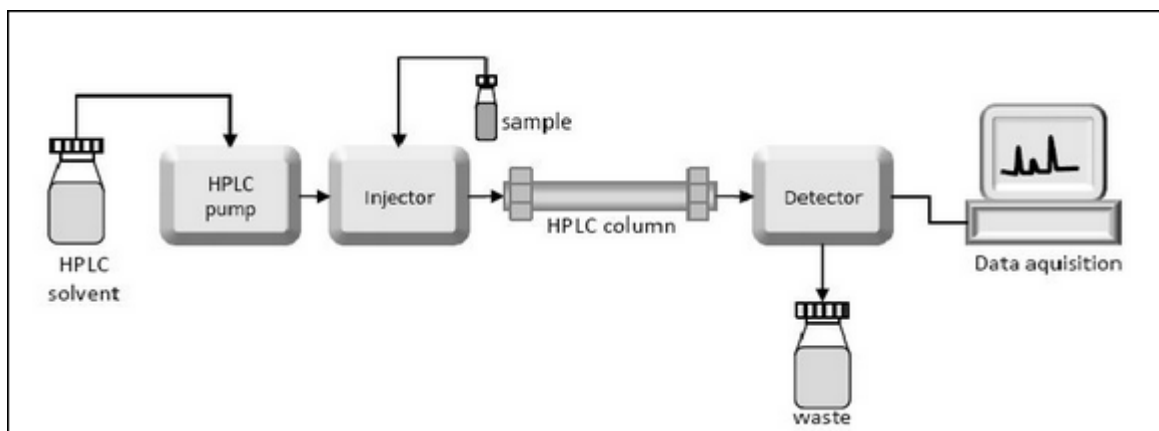
3.9 Væskekromatografi

Ved en kromatografisk separasjon benyttes enten en væske eller en gass (mobilfase) til å transportere prøven over enten en væske eller et fast stoff som ligger i ro (stasjonærfase). I væskekromatografi er stasjonærfasen typisk porøse partikler med stor overflate og med aktive funksjonelle grupper på overflaten. Interaksjoner mellom analytten og funksjonelle grupper på overflaten er avgjørende for separasjon, jo sterkere slike interaksjoner er, desto større vil retensjonen bli.

I væskekromatografi skilles det mellom tre forskjellige separasjonsprinsipper: normalfasekromatografi, omvendt-fase-kromatografi og eksklusjonskromatografi. I oppgaven ble det brukt omvendt-fase-kromatografi. Prinsippet for separasjonen er at mobilfasen er mer polar enn stasjonærfasen slik at analytter ekstraheres fra vandige løsninger. Mobilfasen er en blanding av vann og et organisk løsemiddel som er blandbar med vann, for eksempel acetonitril, metanol eller tetrahydrofuran. Stasjonær fase består av porøse partikler med upolare grupper på for eksempel C18-materiale. Hydrofobe interaksjoner i form av Van der Waal krefter som oppstår mellom stasjonær fasen og analytten gjør at mest hydrofobe stoffer retarderes mest [45].

3.9.1 HPLC

High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) systemet består av en kolonne pakket med stasjonærfase, to mobilfasereservoarer, pumper til hver mobilfase, autoinjektor, degasser, og detektor. Mobilfase presses gjennom kolonnen som ofte har omvendt-fase materiale. Stoffene injiseres ved hjelp av en autoinjektor i strømmen av mobilfase. Pumpene presser mobilfase med konstant hastighet. Stoffene som separeres på kolonnen, bringes med mobilfasen som tilslutt detekteres med en detektor (Figur 8) [45].



Figur 8- Skjematisk oversikt over HPLC-system (<http://www.intechopen.com/books/column-chromatography>).

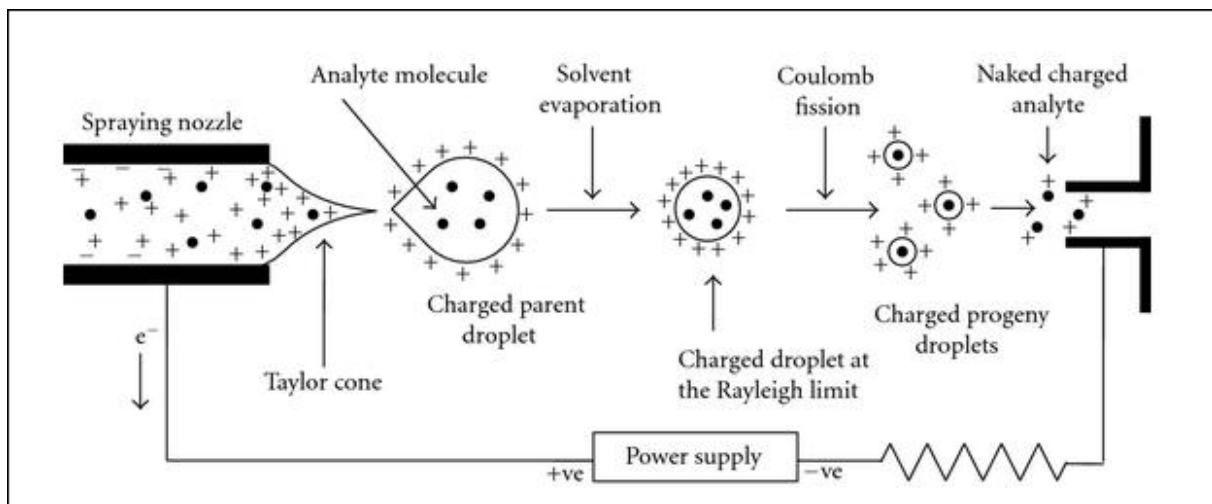
3.10 Deteksjon

3.10.1 Massespektrometri

Et massespektrometer består av en ionekilde, en pumpe, et vakuum, en masseanalysator, en detektor og en datamaskin. Analyttene separeres på en HPLC-kolonne, hvor mobilfasen skal være flyktig slik at det dampes av i ionekilden. Videre føres analyttene til en ionekilde og ioniseres. Fragmentionene føres deretter inni i masseanalysatoren, hvor de separeres etter forholdet mellom masse og ladning m/z . Mengde ioner ved de ulike masser registreres av en detektor. Resultatene behandles elektronisk av en datamaskin, dette danner grunnlaget for registrering og plotting av massespekteret [45, 47].

3.10.2 Ionkilde

Det finnes forskjellige ioniseringsteknikker, en av dem er elektrospayionisasjon (ESI). ESI brukes mye til peptidanalyse når MS benyttes som detektor i HPLC [47]. ESI brukes på basiske eller sure forbindelser. For å få bra signal i MS er det viktig at stoffene er ionisert i mobilfasen fra HPLC-systemet. Mobilfasen har ofte lav pH, og fører til at basiske grupper på aminosyrer foreligger i ladet form. ESI har flere fordeler; den er lett å bruke og har lav deteksjons grense. I tillegg er ESI svært mild ioniseringsform, som lett ioniserer polare, ikke-flyktige, høy molekylærvækt og termolabile forbindelser. Dette muliggjør dannelsen av multiple ladete ioner av type $[M + nH]^{n+}$. Dette vil dermed gjøre at ESI er en egnet teknikk for MS-analyse av store peptider. Prinsippet for ESI er at mobilfasen fra HPLC passerer gjennom et trangt kapillærrør.



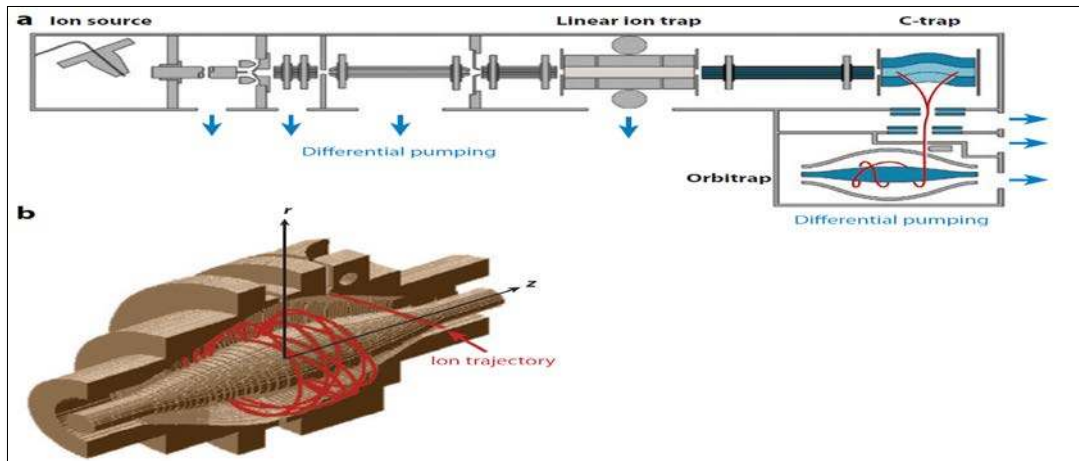
Figur 9- Prinsipper for ESI [48].

Det benyttes en elektrisk energi (spenning på 2-5KV) for overføring av ioner fra en oppløsning til en gassfase. Denne overføringen omfatter tre trinn: 1) ved utgangen av kapillæret forstøves mobilfasen med nitrogengass slik at det dannes aerosol av ladede dråper, 2) løsningsmiddelet fordampes ved hjelp av en tørrgass, 3) fordamping av løsningsmidlet fører til mindre dråper med økt ladningstetthet. Økt ladningstetthet gir en stor overflatespenning og dråpene brytes ned til mindre dråper (Coulomb fission). Denne prosessen gjentar seg til det dannes enkelte ioner fri fra løsningsmiddelet. Disse ionene vil etter hvert bli dyttet inn i masseanalysatoren (Figur 9) [47, 49, 50].

3.10.3 Masseanalysator

Det finnes forskjellige typer masseanalysator som ofte koples til ESI kilden; trippel kvadrupol, ionefelle og *time of flight* (TOF), i denne oppgaven er det brukt LTQ Orbitrap (Figur 10). LTQ orbitrap består av tre deler: 1) en lineær ionefelle for å velge, fange, fragmentere og detektere ioner med høy sensitivitet men relativt lav oppløselighet og massenøyaktighet. I tillegg har den lineære ionetrap evnen til å være rask og i stand til å danne flere nivåer av fragmenter 2) en C-felle for midlertidig ionelagring før ionene pulserende overføres til Orbitrap. Denne ekstra lagringskapasiteten til C-fellen forbedrer de analytiske egenskapene til instrumentet. 3) en orbitrap analysator detekterer ioner med høy massenøyaktighet og høy oppløselighet [51, 52].

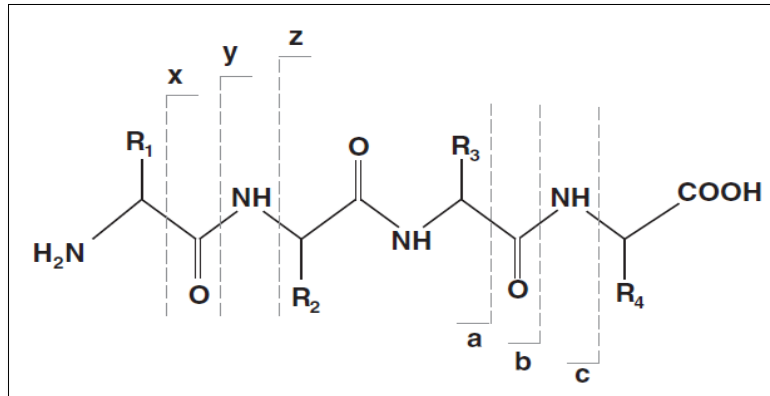
Ioner, generert fra ESI entrer først til den lineære ionefellen som består av fire elektroder, ligget parallelt mellom to end-cap elektroder. Ionene fanges i fellen ved et radially todimensjonalt (2D) radio frekvens (RF) felt fra ringelektroder og aksialt ved å applisere *stopping-potentials* på endelektroder. Når disse ioner akkumuleres høyt nok endres RF spenningen og dermed vil de overføres de til C-fellen. På C-fellen oppbevarer ioner og overføres pulserende til orbitrap. Orbitrap består av en ytre tønneformet elektrode og en coaxial indre spindelliknende elektrode som danner et elektrisk felt. Ionene injisert til orbitrap blir elektrostatiske fanget på grunn av balansen mellom tiltrekningen i den indre elektrode og sentrifugalkreftene fra spindelen. På denne måten vil ionene bevege seg både fram og tilbake langs den sentrale elektroden og samtidig gå rundt i bane. Disse bevegelser som er i form av rotasjoner og oscillasjoner langs den sentrale elektrode induserer et bilde av strømsignaler på den ytre elektroden. Disse strømsignaler må tolkes til frekvenser. Tolking av frekvenser karakteristisk for hvert m/z til massespekter skjer ved hjelp av Fourier transformasjon [6, 51-56].



Figur 10- Oversikt over LTQ-Orbitrap [54].

3.10.4 MS/MS fragmentering av peptider

Det er fastslått at den lineære ionefellen er ideell for fragmentering av peptider fordi den vil eliminere falsk positiv identifikasjon av stor-skala bottom-up proteomikk eksperimenter. Dette skjer ved at den lineære ionefellen isolerer og fragmenterer valgte ioner for analyse og sender både full scann MS og påfølgende MS^n fragmenter til Orbitrap. Orbitrap har evnen til nøyaktig massedetektering og har en høy oppløselighet. Derfor kombineres ofte disse to enhetene sammen [55]. Fragmentering av ioner i den lineære ionefellen skjer når isolerte ioner kolliderer med inert gass. Når en del ioner fragmenterer, blir det potensiellforskjell mellom fragmenterte og ikke fragmenterte ioner og dermed forsterkes fragmentering av andre ioner. Gassen kan være He, N_2 eller Ar er enten tilstede i en separert kollisjonscelle eller som gass i ionefellen. Dette kalles kollisjon induisert dissosiasjon (CID). Kollisjon av ioner med gass fører til backbone fragmentering av karbonyloxygenet (C) og amidnitrogenet (N) og dermed dannelse av en rekke b-fragmenter og y-fragment ioner (Figur 11). Y-ioner dannes når det er positivladning på C terminalen, mens b-ioner dannes når det er positiv ladning på N-terminalen. Andre type ioner (a, b, x, z) kan også dannes, men dannelsen krever høyere energi [6, 57].



Figur 11- Fragmentering av peptider av CID. Nomenklatur av peptidfragmenter: a-, b- og c-type ioner dannes ved N-terminalen av peptidet, mens x-, y-, og z-type ioner dannes ved C-terminalen. R1, R2, R3, R4 representerer side kjeden med forskjellige masser [57].

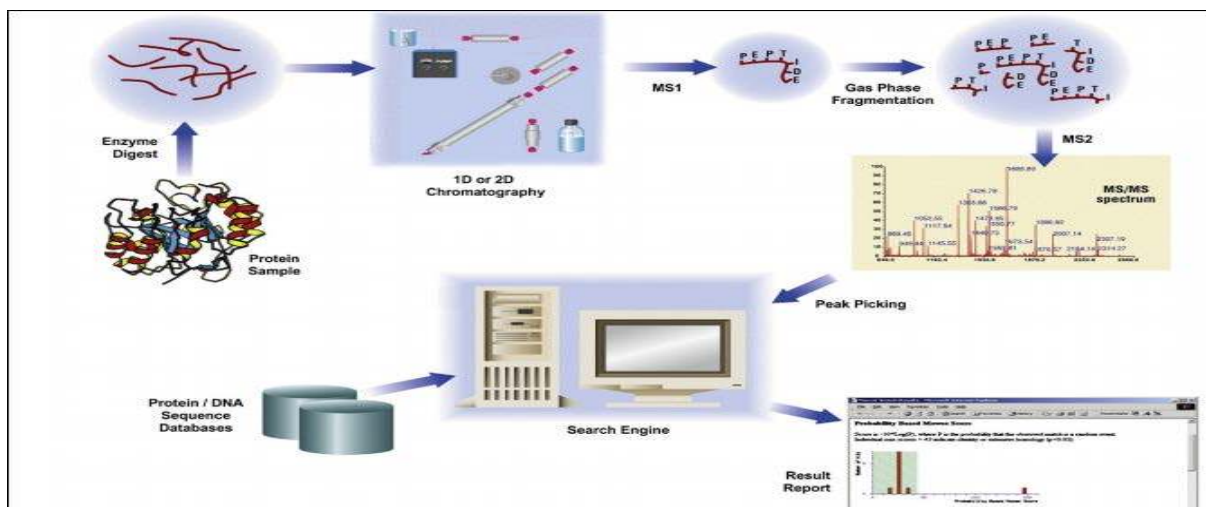
3.11 Proteinidentifisering ved hjelp av MS/MS data

MS spekteret som genereres fra en LC-MS/MS analyse inneholder på x-aksen m/z verdi av både peptider i ioneform (MS_1) og deres fragmentioner (MS/MS eller MS_2) som er assosiert med deres ion intensitet på y-aksen. Dette spekteret blir sammenlignet med teoretiske MS-spekter i en database (Figur 12). For å kunne sammenligne eksperimentelle og teoretiske peptidmassene med hverandre, må de samme parametre brukes. Slike parametre er bruk av samme enzym brukt for proteolyse og valg av samme kjemiske modifikasjoner som kan være tilstede. Etter sammenligning registreres en score etter hvor god treffet er, og som er avhengig av et identifikasjons algoritme som er unik for hvert peptid spektrum match (PSM).

SEQUEST er en scoringsalgoritme som korrelerer mellom eksperimentelt MS og teoretisk MS. Jo høyere score desto bedre er treff mellom eksperimentell MS og teoretisk MS [58-60].

SEQUEST rangerer score med grønne, gule, og røde treff hvor:

- Grønn indikerer *high-confidence peptides*
- Gul indikerer *medium-confidence peptide*
- Rød indikerer *low-confidence peptide*



Figur 12- Protein identifisering ved hjelp av MS/MS data [60].

4 Materialer og metoder

4.1 Materialer

4.1.1 Kjemikalier, proteiner og utstyr.

Tabell 6-13 viser oversikt over kjemikalier, enzymer, proteiner, eksosomer og utstyr som ble brukt i oppgaven

Tabell 6 kjemikalier

Kjemikalier	Molekylvekt	Kvalitet	Leverandør
Acetonitril CH ₃ CN	41 g/mol	≥ 99,9 % LC-MS kvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Natriumklorid NaCl	57,9 g/mol	≥ 99,5 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Metanol CH ₃ OH	32 g/mol	≥ 99,9 % LC-MS kvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Maursyre HCOOH (Formic acid)	46 g/mol	~ 98 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimethyl sulfoksid C ₂ H ₆ OS	78 g/mol	≥ 99,7 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Jodeddiksyre (IAA) C ₂ H ₃ IO ₂	185,9 g/mol	≥ 98,0 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DTT (DL- Dithiothreitol) C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂	154 g/mol	≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris base C ₄ H ₁₁ NO ₃	121 g/mol	≥ 99,9 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris HCl	157, 6 g/mol	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TFA, trifloreddiksyre CF ₃ CO ₂ H	113,99 g/mol	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabell 7 Enzymer

Enzym	Kvalitet	Leverandør
Trypsin fra storfe	Essensielt Saltfri, lyofilisert	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PNGase F (Peptid-N-glykosidase F)	≥95 % (SDS-PAGE)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabell 8 Proteiner

Protein ID	Proteinnavn Nummer	Kilde til protein	Produkt nummer	Protein vekt	Leverandør
P00004	Cytochrom C	Hestehjerte	C7150	12,4 kDa	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
P68082	Myoglobin M	Hestehjerte	M1882	17 kDa	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
P02754	β-lactoglobulin	Storfemelk	L3908	20 kDa	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
P00921	Carbonic anhydrase isozym II	Storfe erythrocytter	C2522	29 kDa	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
P01012	Ovalalbumin	Kylling eggehvite	A2512	42,9 kDa	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
P00432	Catalase	Storfelever	C40	250 kDa	Sigma-Aldrich,

					St.Louis, MO, USA
P02787	Serotransferrin	Human	T8158	77,7 kDa	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
P00489	Fosforylase B	Kaninmuskel	P6635	97,2 kDa	Sigma-aldrich, St.Louis, MO, USA
P02769	Serumalbumin	Storfeserum	A9418- 5G	66 kDa	Sigma-aldrich, St.Louis, MO, USA
P12763	Fetuin A	Føtalt storfeserum	F2379	48,4 kDa	Sigma-aldrich, St.Louis, MO, USA

Tabell 9 Eksosomer

Eksosomer	Kvalitet	Leverandør
Eksosomer isolert fra urin (fra frisk donor)	Lyofilisert eksosomer	Hansa BioMed, EU

Tabell 10 Utstyr til filtrering av urin

Utstyr	Type	Leverandør
Vivaspin 6	5,000 MWCO filter	Sartorius Stedim Goettingen, Tyskland
Vivaspin 20	100,000 MWCO filter	Sartorius Stedim Goettingen, Tyskland
Vivaspin 20	1000,000 MWCO filter	Sartorius Stedim Goettingen, Tyskland

Tabell 11 Utstyr til SPE

Utstyr	Modell/type	Leverandør
Octadecyl C8 47mm	Empore ekstraksjons disk	Phenomenex B.V Utrecht, Nederland
Octadecyl C18 47mm	Empore ekstraksjon disk	Phenomenex B.V Utrecht, Nederland
Pipetespisser	200 µL	BIOHIT, USA
Glasspipetter	230 mm	Bilbate, Nederland

Tabell 12 Utstyr LC-MS/MS

Utstyr	Modell	Leverandør
Autosampler/injektor	Ultimate 3000 RS	Dionex Sunnyvale, CA, USA
Pumper	Ultimate 3000 pump	Dionex, Sunnyvale, CA, USA
For kolonne	Acclaim PepMap 100 C18 5mm x 300µm id , 5 µm	Dionex Sunnyvale, CA, USA
Separasjonskolonne	Acclaim PepMed 100 150 x 0,075 mm id, partikkeldiameter 3 µm, porestørrelse 100 Å,	Dionex Sunnyvale, CA, USA
ESI ionekilde	360 µm od x 20 µm id, 10 µm id tip	Thermo Fischer, Bremen, Tyskland
Orpitrapp	LTQ Discovery Orbitrap MS	Thermo Fischer, Bremen, Tyskland
Programvare	Xalibur Software versjon 2.0.7	Thermo Fischer, Bremen, Tyskland
Programvare	Proteome Discoverer versjon 1.4	Thermo Fischer, Bremen, Tyskland

Tabell 13 Øvrige utstyr

Utstyr	Modell/type	Leverandør
Eppendorfrør	Protein LoBind Tube 1,5 mL	Eppendorf AG Hamburg, Tyskland
Eppendorfrør	Protein LoBind Tube 2,0 mL	Eppendorf AG Hamburg, Tyskland
Vialer	32,11 x 6 mm	Holger Teknologi AS, Oslo, Norge
Micro-insert	0,1 ml, 31 x 6 mm clear glass	VWR International
Korker til vialer	-	Holger Teknologi AS, Oslo, Norge
Milli-Q vann	Renset vann (Vent filter MPK01)	Millipore, Norge
Ultralydbad	5510EDTH	Branson, USA
Speedvac med vakuum	SPD121P, RVT4104	Thermo Electron Corporation, USA
Sentrifuge, liten	Galaxy mini	VWR Korea
Sentrifuge, stor	5804	Eppendorf AG Hamburg, Tyskland
Thermomixer	Comfort Eppendorf 1,5 mL	Thermo, Fisher Scientific, Norge
pH-måler	pH-meter	Metrohm, Sveits
Hansker	Pulverfri	VWR
Finpipetter	M10, M20, M200 M100, M1000, M5000	Helsinki, Finland Thermo Scientific, USA
Pipettespisser	10µl, 100µl, 1000µl, 5mL	Helsinki, Finland Thermo Scientific, USA
Vekt	Mettler AE 200	Mettler Instrument AG, Sveits

Finnvekt	Mettler	Mettler Toledo, Sveits
Plastikk veieskip	46x46x8mm	VWR Kina
Vortexmikser	IKA MS 3 digital	IKA, USA
Prøvemikser	Hulamikser	Invitrogen, Oslo, Norge

4.1.2 Tillaging av buffere og løsninger

Tillaging av buffere

100 mM Tris base

1,2114 g skal veies i veieskip og løses i 100 mL destillert vann i målekolbe.

100 mM Tris HCl

1,576 g veies i et veieskip og løses i 100 mL destillert vann i målekolbe

100mM Tris-HCl buffer med pH 8,3

50 mL tris blandet med 20 mL tris HCl, pH måles til 8,3

50mM tris-HCl buffer

50 mL 100 mM tris-HCl bufferen blandes med 50 mL destillert vann, pH måles til 8.3

TFA løsninger

10 % TFA lages ved å fortynne 1 mL 100 % TFA med 9 mL vann. Videre lages 1 %, 0,1 % og 0,01 % av 10 % TFA.

50 mM tris HCl, 150 mM NaCl

0,8766 g NaCl veies i veieskip og løses i Ca.100 mL destillert vann, deretter tilsettes 5 mL av 1 M tris HCl. pH måles til 8,4

4.1.3 Tillaging av reagenser

Reduseringsreagens

1 M DTT: 15,4 mg veies og løses 100 μ L i tris-HCl buffer umiddelbart før bruk.

10 mM DTT: 5 μ L av 1M DTT løsning tilsettes til 500 μ L prøve.

20 mM DTT: 0,8 μ L av 1M DTT løsning tilsettes til 40 μ L prøve.

Alkyleringsreagens

1M IAA: 18,59 mg veies i eppendorfrør og løses i 100 μ L tris-HCl buffer umiddelbart før bruk.

30 mM IAA: 15 μ L av 1M IAA løsning tilsettes til 500 μ L prøve.

60 mM IAA: 1,8 μ L av 1M IAA løsning tilsettes til 30 μ L prøve.

4.1.4 Tillaging av proteinmikstur og enzymløsninger

10 proteinmikstur

1 mg veies av hvert protein og fortynnes med 1 mL tris-HCl buffer. Videre fortynnes denne konsentrasjonen til 1 μ g/ μ L. Fra denne fortynningen som er for hvert protein tas ut 50 μ L og blandes sammen til et volum på 500 μ L.

PNGase F

Vial med 50 enheter PNGase F sentrifugeres kort før åpning for å sikre at det frysetørrede stoffet er i bunnen av vialet. Deretter lages 500 enheter/mL ved å tilsette 100 μ L rent vann til vial med 50 enheter. Så fortynnes denne enzymløsningen med passende vann mengde til ønsket formål.

Trypsin

Det ble laget nye trypsin løsninger hver gang rett før bruk.

1 mg/mL trypsin-løsning: 1 mg tørr stoff veies og løses i 1 mL 50 mM tris-HCl buffer.

0,1 μ g/ μ L trypsin-løsning: 10 μ L av 1 mg/mL trypsin-løsning fortynnes med 90 μ L av 50 mM tris-HCl buffer.

0,01 µg/µL trypsin-løsning: 10 µL av 0,1µg/µL trypsin løsning fortynnes videre med 90 µL av 50mM tris-HCl buffer.

4.1.5 SPE-løsninger

Kondisjonering: 100 % ACN

Vask: 0,1 % TFA lages ved å blande 10 µL fra 10 % TFA med 990 µL vann.

Eluering: 80 % ACN, 0,1 FA % lages ved å blande 8 mL ACN+2 mL 0,1 % FA.

4.1.6 Mobilfaser

Mobilfaser med DMSO

Loading buffer: 500 mL 3 % ACN, 0,1 % FA lages ved å blande 15 mL ACN, 0,5mL FA og 484,5 mL mq vann.

Mobilfase A: 1 L 5 % ACN, 3 % DMSO, 0,1 % FA lages ved å blande 50mL ACN, 30 mL DMSO, 1 mL FA og 919 mL mq vann.

Mobilfase B: 500 mL 95 % ACN, 3 % DMSO, 0,1 % FA lages ved å blande 475 mL ACN, 15mL DMSO og 0,5 ml FA i 9,5 mL mq vann.

Mobilfaser uten DMSO

Loading buffer: 500 mL 3 % ACN, 0,1 % FA lages ved å blande 15 mL ACN, 0,5 mL FA og 484,5 mL mq vann.

Mobilfase A: 1 L 5 % ACN, 0,1 % FA lages ved å blande 50 mL ACN, 1 mL FA og 949 mL mq vann.

Mobilfase B: 500 ml 95 % ACN, 0,1 % FA lages ved å blande 475 mL ACN og 0,5 ml FA i 24,5 mL mq vann.

Løsninger blandes godt sammen og settes på ultralydbadet i 5 minutter for å fjerne luftbobler.

4.2 Metoder

4.2.1 Tillaging av SPE-tip

SPE-tipene ble laget av C8 og C18 materiale i plastpipetter ved å stanse ut 6 biter av C8 og 6 biter av C18 materiale fra C8 og C18 disk ved hjelp av en glasspipette, videre brukes en metalltråd til å overføre C8 og C18 materialet til bunnen av en 200 µL plast-pipettespiss. Materialer pakkes forsiktig inni pipettespissen (SPE-tip). Det lages hull på toppen av eppendorfrør slik at pipettespissen kan settes inn.

4.2.2 Deglykosylering, trypsinering, redusering og alkylering av 10-proteinmikstur.

- 1- 500 µL av 10-proteinmikstur lages slik som nevnt under kapitel 4.14
- 2- 1 M DDT lages fersk og 5 µL av denne tilsettes til 500 µL av 10-proteinmikstur (10 mM DTT blir i sluttløsning). Blandingen vortekses, spennes ned og inkuberes ved 37 °C 800 rpm i 20 minutter. Prøven avkjøles i 5 minutter.
- 3- 1M IAA lages fersk, og 15 µL av denne løsningen tilsettes 500µL med 10-proteinmikstur (30 mM IAA blir i sluttløsning), vortekses, spennes ned og inkuberes i mørket ved romtemperatur i 20 minutter.
- 4- 79 µL av 50 mM tris buffer fordeles i 6 eppendorfrør. Deretter tilsettes 6 µL av 10-proteinmikstur (DTT og IAA behandlet) til hvert rør, slik at det blir 6 paralleller.
- 5- 5 µL av (0,5enheter/µL) PNGase F enzymet tilsettes til 3 Paralleller, alle prøvene inkuberes ved 37 °C i 1 time før trypsinering.
- 6- 1mg/mL trypsin lages fersk og fortynnes videre til 0,01µg/µL. Protein trypsin forholdet er 1:40 → $1/40 \times 6 \mu\text{L} = \underline{0,15} \mu\text{L}$.
- 7- 15 µL av 0,01µg/µL trypsin tilsettes. Totalt volumet i hvert rør blir 100 µL.
- 8- Prøvene trypsinenes i 5 minutter ved 37 °C.
- 9- 5 µL 100 % FA tilsettes til alle rør for å stoppe trypsin aktivitet.

4.2.3 SPE-prosedyre

1. 10 μL av 1 % TFA tilsettes til hver eppendorfrør med prøve.
2. 100 μL 100 % ACN tilsettes hver SPE-tip for å fukte sorbenten, sentrifugeres 3000 rpm i 3 minutter for å få væsken å gå gjennom SPE-tip.
3. 100 μL av 0,1 % TFA tilsettes hver tip for å vaske bort rester av ACN, sentrifugeres 4000 rpm i 3 min.
4. Prøven påsettes, sentrifugers 2000 rpm i 3 min, deretter 5000 rpm i 5 min. SPE-tippene vaskes med 100 μL 0,1 % TFA, sentrifugeres 3000 rpm i 3 min og så i 5000 i 5 min.
5. Eppendorfrør byttes!!
6. Prøvene elueres med 200 μL 80 % ACN, sentrifugeres 3000 rpm i 3 min, så 5000 rpm i 5 min.
7. Prøvene fordampes på speedvac ved 50 °C i 1,5 time eller til de fordampes.
8. Etter fordamping, re-løses prøvene i 8 μL 70 % FA, vortekses, tilsettes 72 μL 0,01 % TFA. Prøver (80 μL) pipetteres til micro-inserter satt i små vialer. Tre vialer (blank prøve) fylles med loading buffer. FA ble tilsatt til prøver slik at basiske grupper på peptider blir positiv ladet, og ESI blir kjørt på positiv mode.

4.2.4 Deglykosilering, trypsinering, redusering og alkylering av eksosom standardløsning.

- 1- 1 vial med 30 μg eksosomer løses i 40 μL mq vann, re suspenderes ved vorteksing/virvling i 60 sek, spinnes ned.
- 2- 1 M DTT stamløsning lages fersk, og 0,8 μL av denne løsningen tilsettes til vial med 40 μL av eksosom standardløsning (20 mM DTT blir i sluttløsningen). Blandingen vortekses, spinnes ned og inkuberes ved 37 °C 800 rpm i 20 minutter. Kjøles for 5 minutter.
- 3- 1 M IAA stamløsning lages fersk, og 2,4 μL av denne løsningen (60 mM IAA blir i sluttløsning) tilsettes til 40 μL DTT behandlet eksosom standardløsning. Prøven vortekses, spinnes ned og inkuberes i mørket ved romtemperatur 800 rpm i 20 minutter.

- 4- 79 μL av 50 mM tris-HCl buffer fordeles til 2 eppendorfrør og 84 μL av samme buffer fordeles til 2 nye eppendorfrør. Deretter fordeles 40 μL av redusert og alkylert eksosom standardløsning opp i de 4 eppendorfrør med buffer, 10 μL i hver.
- 5- 5 μL av (0,5 enheter/ μL) PNGase F enzymet tilsettes til 2 paralleller. Alle 4 paralleller med og uten PNGase F inkuberes ved 37 °C i 1 time før trypsinering.
- 6- 1 mg/mL trypsin lages fersk, og fortynnes videre til 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.
- 7- 6 μL av 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ trypsinløsning tilsettes til alle paralleller.
- 8- Prøvene trypsinenes i 5 minutter ved 37 °C.
- 9- Proteolysen stoppes etter 5 minutter ved å tilsette 5 μL 100 % FA til alle prøver.
- 10- Prøvene SPE behandles som beskrevet under 4.2.3.
- 11- Etter SPE fordampes prøvene på speedvac ved 50 °C i 1,5 time eller til de fordampes.
- 12- Før MS-analyse re-løses prøvene i 8 μL 70 % FA, vortekses og tilsettes 72 μL 0,01 % TFA. Prøver (80 μL) pipetteres til micro-inserter satt i små vialer. Tre vialer (blank prøve) fylles med loading buffer.
- 13- MS-analyse.

4.2.5 Deglykosilering, trypsinering, redusering og alkylering av større mengde eksosom standardløsning.

- 1- 2 x 30 μg vial med eksosomer standardløsning løses i 30 μL mq vann i hver, re suspenderes ved vorteksing/virvling i 60 sek, spinnes ned.
- 2- 1 M DTT stamløsning lages fersk, og 0,6 μL av denne løsningen tilsettes til hvert vial med 30 μL av eksosom standardløsning (20 mM DTT blir i sluttløsningen). Blandingen vortekses, spinnes ned og inkuberes ved 37 °C, 800 rpm i 20 minutter. Kjøles ned for 5 minutter.
- 3- 1 M IAA stamløsning lages fersk, og 1,8 μL av denne løsningen (60 mM IAA blir i sluttløsning) tilsettes til hver vial DTT behandlet eksosom standardløsning. Prøvene vortekses, spinnes ned og inkuberes i mørket ved romtemperatur, 800 rpm i 20 minutter.
- 4- 79 μL av 50 mM tris-HCl buffer fordeles til 3 eppendorfrør og 84 μL av samme buffer fordeles til 3 nye eppendorfrør. Deretter fordeles 2 x30 μL av redusert og alkylert eksosom standardløsning i de 6 eppendorfrør med buffer, 10 μL i hver.
- 5- 5 μL av (0,5 enheter/ μL) PNGase F enzymet tilsettes til 3 paralleller. Alle paralleller med og uten PNGase F inkuberes ved 37 °C i 1 time før trypsinering.

- 6- 1 mg/mL trypsin lages fersk, og fortynnes videre til 0,1µg/µL.
- 7- 6 µl av 0,1µg/µl trypsinløsning tilsettes til alle paralleller ved 37 °C. Proteolysen stoppes etter 5 minutter ved å tilsette 5 µL 100 % FA til alle paralleller.
- 8- Prøvene SPE behandles som beskrevet under 4.2.3
- 9- Etter SPE fordampes prøvene på speedvac ved 50 °C i 1,5 time eller til de fordampes.
- 10- Før MS-analyse re-løses prøvene i 8µL 70 % FA, vortekses og tilsettes 72 µL 0,01 % TFA. Prøver (80 µL) pipetteres til micro-inserter satt i små vialer. Tre vialer (blank prøve) fylles med loading buffer.
- 11- MS-analyse.

4.2.6 Isolering av eksosomer fra urin

Bruk av 5 KDa filter

1. 2 rør med 20 mL urin (morgenurin) sentrifugeres ved 1000*g i 10 min.
2. 30 mL supernatant fra begge rørene overføres til 6 vivaspinnrør (5,000 MWCO) med 5 mL i hvert rør.
3. 5 mL supernatant filtreres i vivaspinnrør til et sluttvolum på ca. 200 µL (sentrifugering 9000x g).
4. Rørene vaskes så med 5 mL 50mM tris-HCl/NaCl buffer 150mM.
5. De 200 µL oppkonsentrert urin tilsettes 1200 µL 50mM tris-HCl/NaCl buffer, ristes ved 600 rpm i 30 min.
6. Prøven overføres fra vivaspinnrør til 6 eppendorfrør med 400 µL i hver.
7. 1 M DTT stamløsning lages fersk og 4 µL av denne løsningen (10 mM av DTT i sluttløsning) tilsettes hvert prøve. Prøvene vortekses, spinnes ned og inkuberes ved 37 °C, 800 rpm 15 minutter. Kjøles for 5 minutter.
8. 1 M IAA lages fersk som stamløsning, og 12 µL av denne løsningen (30mM i sluttløsning) tas ut og tilsettes til hvert DTT behandlet prøve. Prøvene vortekses spinnes ned og inkuberes i mørket i 15 minutter.
9. 5 µL av PNGase F tilsettes til 3 paralleller og alle prøver både med og uten PNGase F inkuberes 2 timer ved 37 °C.
10. 30 µl av 0,1 µg/µl trypsin tilsettes hvert rør, inkuberes ved 37 °C i 5 minutter.
11. trypsin klipping stoppes ved å tilsette 5 µL 100 % FA.
12. prøvene SPE-behandles som beskrevet under 4.2.3.

13. prøvene fordampes på speedvac ved 50 °C i 1,5 time eller til de fordampes.
14. Før MS-analyse re-løses prøvene i 10µl 70 % FA, vortekses og tilsettes 80 µl 0,01 % TFA. Prøver (100µL) pipetteres til micro-inserter satt i små vialer. Tre vialer (blank prøve) fylles med loading buffer.
15. MS-analyse.

4.2.7 Bruk av 1000 KDa filter

- 1) 4 rør med 50 mL urin (morgenurin) sentrifugeres ved 1000*g i 10 min,
- 1) 45 mL supernatant overføres til 4 nye rør
- 2) 30 µl vial med standard eksosomer løses 200 µL mq vann. 200 µL av denne løsningen overføres til 2 rør med 45 mL urin
- 3) 45 mL fra hvert rør filtreres i 4 vivaspinnrør (1.000, 000 MWCO) med 15 mL hver gang til hele 45 mL urin filtreres gjennom.
- 4) Det totale volumet av supernatant filtreres i vivaspinnrør til et sluttvolum på ca. 200 µL (sentrifugering 9000x g).
- 5) Rørene vaskes så med 15 mL 50mM tris-HCl/150 mM NaCl buffer.
- 6) De 200 µL oppkonsentrert urin i hvert vivaspinnrør tilsettes 200 µL tris-HCl/NaCl buffer og ristes ved 600 rpm i 30 min.
- 7) Prøven overføres fra vivaspinnrør til 2 eppendorfrør (2 rør urin spiked med eksosomer + 2 rør uten eksosomer) med 800 µL i hver. Begge rørene DTT og IAA behandles.
- 8) 1 M DTT stamløsning lages fersk, 8 µL (10mM i sluttløsningen) tilsettes hvert prøve, vortekses og spennes ned. Inkuberes ved 37 °C, 800 rpm i 15 minutter. Kjøles for 5 minutter.
- 9) 1 M IAA stamløsning lages fersk, 24 µL av denne løsningen (30mM i sluttløsningen) tilsettes hvert prøve. Prøvene vortekses, spennes ned og inkuberes i mørket i 15 minutter.
- 10) 800µL DTT og IAA behandlet prøve uten eksosomer og med eksosomer fordeles på 12 eppendorfrør
- 11) 10 µL PNGase F ble fortynnet med 55 µL 150 mM NaCl 50 mM HCl buffer. 10 µL av PNGase F fortynningen tilsettes til 6 eppendorfrør; 3 rør med spiked med eksosomer og 3 rør uten eksosomer. Alle 12 prøver behandles likt, inkuberes ved 37 °C i 4 timer.
- 12) 9 µL av 0,1µg/µL trypsin tilsettes til hvert prøve, inkuberes ved 37 °C i 5 minutter
- 13) trypsin klipping stoppes ved å tilsette 5 µL 100 % FA.

- 14) Prøvene SPE-behandles som beskrevet under 4.2.3.
- 15) prøvene fordampes på speedvac ved 50 °C i 1,5 time eller til de fordampes.
- 16) Før MS-analyse re-løses prøvene i 8 µL 70 % FA, vortekses og tilsettes 72 µL 0,01 % TFA. Prøver (80µL) pipetteres til micro-inserterer satt i små vialer. Tre vialer (blank prøve) fylles med loading buffer.
- 17) MS-analyse.

4.2.8 Bruk av 100 kDa filter

Fire rør med 50 mL (morgenurin) sentrifugeres ved 15000*g i stedet for 1000 *g i 10 min. Resten av prosedyre var som beskrevet under 4.2.7.

4.3 Databaser og verktøy

4.3.1 Proteome Discoverer

Proteome Discoverer versjon 1.4 ble brukt for å identifisere proteiner og deres proteolytiske peptider basert på eksperimentelle data. SEQUEST ble valgt som søkealgoritme, rå filene ble lastet opp, og forskjellige betingelser nevnt under ble valget:-

Søkealgoritme: SEQUEST

Masseintervall: 250,0-10000 Da

Fragmenteringsmåte: CID

Database: fasta filer fra uniprot

Precursor mass Tolerance: 10 ppm

Decoy-database søk: huket på

Enzym: trypsin

Missed cleavages: 3

Konstante modifikasjoner: karboksymetylering av C (+58,005 Da)

Variable modifikasjoner: diamidering av N (+0,984 Da), oksidering av M (+15,995 Da).

4.3.2 ProteinProspector

ProteinProspector Version 5.12.4 (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>) ble brukt i denne oppgaven for å sammenligne eksperimentelle peptidsekvenser med teoretisk sekvenser. Målet for søket var å sammenligne eksperimentelle b- og y- fragmenter med teoretiske samtidig å sjekke om det er forskjell i massen på +1.

Søket ble gjort på denne måten:-

MS-Digest

List over Entries: Skrive inn Protein ID

Konstante modifikasjoner: karboksymetylering av (C)

Variable modifikasjoner: ingen

Proteolyse enzym: Trypsin

Antall tapte kløyvinger: 3

Peptid sekvens: for eksempel, *VLDPTPLANCSVR*

4.3.3 Uniprot

Uniprot (<http://www.uniprot.org>) er en database som har informasjon om protein funksjon, PTM, lokasjon osv. Uniprot ble brukt som kilde i denne oppgaven for å laste opp protein databaser (fasta filer) fra og for å sjekke om eksperimentelle proteiner hadde PTMs, slik glykosylering setter.

Søket ble gjort på denne måten:

Søke på protein ID, undersøke om proteinet er et glykoprotein med N-linked seter

4.4 Metoder for LC-MS analyse

4.4.1 HPLC

Prøven (20 µL) ble injisert til forkolonne med omvendt fase ekstraksjon materialet C18. Loading buffer hastighet var på 10 µL/min for 4 minutter. Så ble analyttene overført til hoved kolonne (væskeshastighet på 300 nL/min). En lineargradient (mobilfase sammensetning endres under analysen) ble kjørt fra 0 % til 50 % mobilfase B i 60 minutter så ble eleueringstyrken økt til 100 % i 4 minutter (Tabell 14).

HPLC- betingelser

Injeksjonsvolum: 20 µL

Væskeshastighet (loading buffer): 10µL/min

Væskeshastighet (prøve): 300 nL/min

Forkolonne: C18, 5mm x 300µm id, 5µm partikkelstørrelse/diameter

Hoved kolonne: 150 x 0,075 mm id, 300 Å porestørrelse, 3 µm partikkeldiameter

Mobilfase med DMSO

Mobilfase A: 0,1 % FA, 5 % ACN, 3 % DMSO

Mobilfase B: 0,1 % FA, 95 % ACN, 3 % DMSO

Mobilfase uten DMSO

Mobilfase A: 0,1 % FA, 5 % ACN

Mobilfase B: 0,1 % FA, 95 % ACN

Analysetid: 90 min

Tabell 14 oversikt over HPLC-gradienter.

Tid (min)	Flow (nL/min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)
0	300	0	0
0-60	300	0	50
61	300	0	100
64	300	0	100
64	300	100	0
74	300	0	0
75	400	0	0
85	400	0	0

4.4.2 MS/MS

Positiv mode ble valgt for ESI, og deteksjonen foregikk i 2 scan events. Ved scan event 1 (*fourier transformation MS*) utføres en full scan mellom 250-2000 Da. I scan event 2 (*Ion Trap MS*) vil de 6 mest intense ioner velges ut og fragmenteres av CID i ionefellen. Etter at det blir tatt 2 MS/MS-spekteret på de mest 6 intense ioner, settes de på eksklusjons liste. Disse ioner vil være 15 s i eksklusjons liste så fjernes de slik at andre ioner kan sette på. Sistnevnte metode kalles dynamikk eksklusjon som gjør det mulig å skaffe både MS/MS og MSⁿ spekter for ioner med lavere intensitet.

ESI-kilde

ESI-mode: positivt

Spray spenning: 2,21 KV

Kapillærspenning: 45,05

Kapillærtemperatur: 350 °C

Tube lens: 119,96

Scan events detaljer

Scan event 1; FTMS

Scantid: 87 min

Scan (m/z område): 250-2000 Da

Oppløsning: 30 000

Scan event 2; ITMS

Scan event 2 må ha data fra de mest intense ioner fra scan event 1 med dynamikk eksklusjon.

Aktiverings type: CID

Minimum påkrevde signal: 100,0

Isolasjons lengde: 2,00

Normalisert kollisjons energi: 35,0

Default lade tilstand: 2

Aktiveringstid: 30 MS

Dynamikk eksklusjons

Repeat count: 1

Repeat Duration: 30,0 sek

Eksklusjons liste størrelse: 500

Eksklusjons varighet: 15,0 sek

Eksklusjons masse bredde, lav: 10,0 PPM

Eksklusjons masse bredde, høy: 10,0 PPM

5 Resultater og diskusjon

I oppgaven ble det først jobbet med modellproteiner i buffer for å bevise at både deglykosylering med PNGase F og trypsinering fungerte. Etter det ble kompleksiteten av prøven gradvis økt til eksosomstandarder i buffer og videre til eksosom (standarder) i urin.

5.1 Bruk av fetuin A som protein modell

Til dette forsøket ble det brukt en blanding av 10-proteinmikstur (*Cytochrom C*, *Myoglobin M*, *β -lactoglobulin*, *Carbonic anhydrase isozym II*, *Ovalalbumin*, *Catalase*, *Serotransferrin*, *Fosforylase B*, *Serumalbumin*, *Fetuin A*). Hvert protein hadde en konsentrasjon på $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ i blandingen, og $6\mu\text{L}$ av denne blandingen ble fordelt på 6 paralleller. Tre paralleller behandlet med- og tre uten PNGase F. Hensikten med å bruke Fetuin A som protein modell var og visse om PNGase F fører til deglykosylering og dermed bedre påvisning av proteinet. Fetuin A er et glykoprotein med glykosylering seter på aminosyrene 99,156, og 176. Figur 13 viser hele aminosyresekvensen til fetuin A.

10	20	30	40	50
MKSFVLLFCL	AQLWGCHSIP	LDPVAGYKEP	ACDDPDTEQA	ALAAVDYINK
60	70	80	90	100
HLPRGYKHTL	NQIDSVKWP	RRPTGEVYDI	EIDTLETTCH	VLDPTPLANC
110	120	130	140	150
SVRQQTQHAV	EGDCDIHVLK	QDGQFVSLFT	KCDSSPDSAE	DVRKLCPCDCP
160	170	180	190	200
LLAPLNDSRV	VHAVEVALAT	FNAESNGSYL	QLVEISRAQF	VPLPVSVSVE
210	220	230	240	250
FAVAATDCIA	KEVVDPTKCN	LLAEKQYGFC	KGSVIQKALG	GEDVRVTCTL
260	270	280	290	300
FQTQPVIPQP	QPDGAEAEAP	SAVPDAAGPT	PSAAGPPVAS	VVVGPSVAV
310	320	330	340	350
PLPLHRAHYD	LRHTFSGVAS	VESSSGEAFH	VGKTPIVGQP	SIPGGPVRLC
PGRIRYFKI				

Figur 13- Aminosyresekvens av fetuin A hvor glykosylerte aminosyrer er merket med gul.

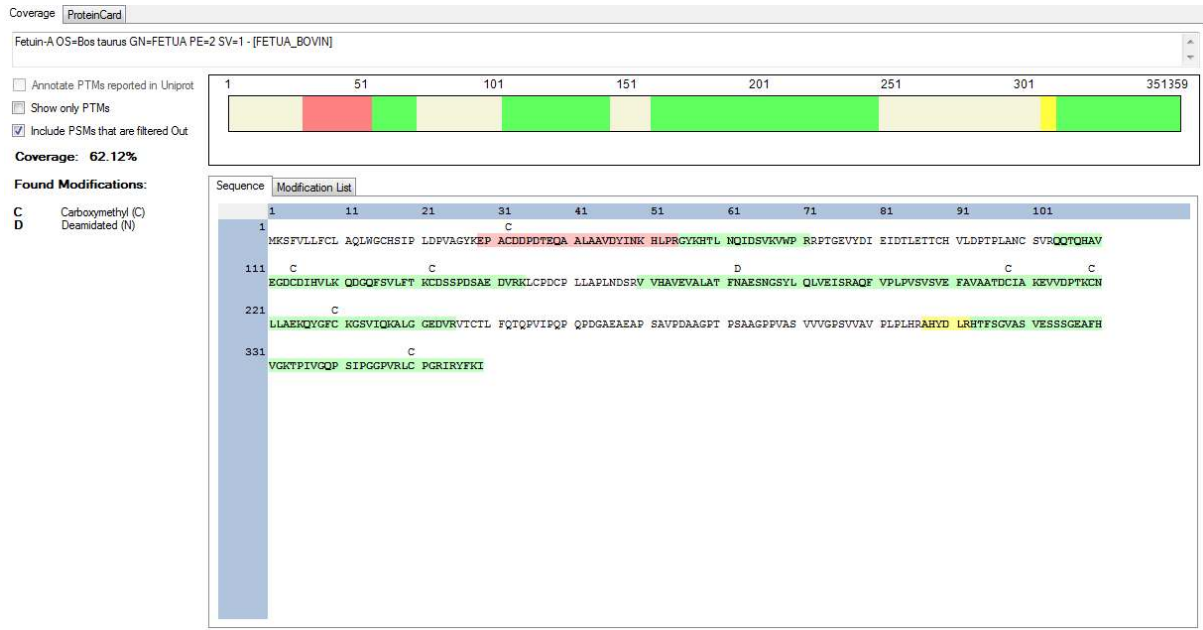
Etter sammenlignet av eksperimentelle MS-data med teoretisk data viste SEQUEST programmet både høyre score og coverage på Fetuin A når PNGase F ble brukt. Høy score og coverage tolkes i programmet til grønt treff på aminosyre nummer 99, 156 og 176 (Tabell 15).

Tabell 15 forskjell i score og coverage på prøver med PNGase F og prøver uten PNGase F.

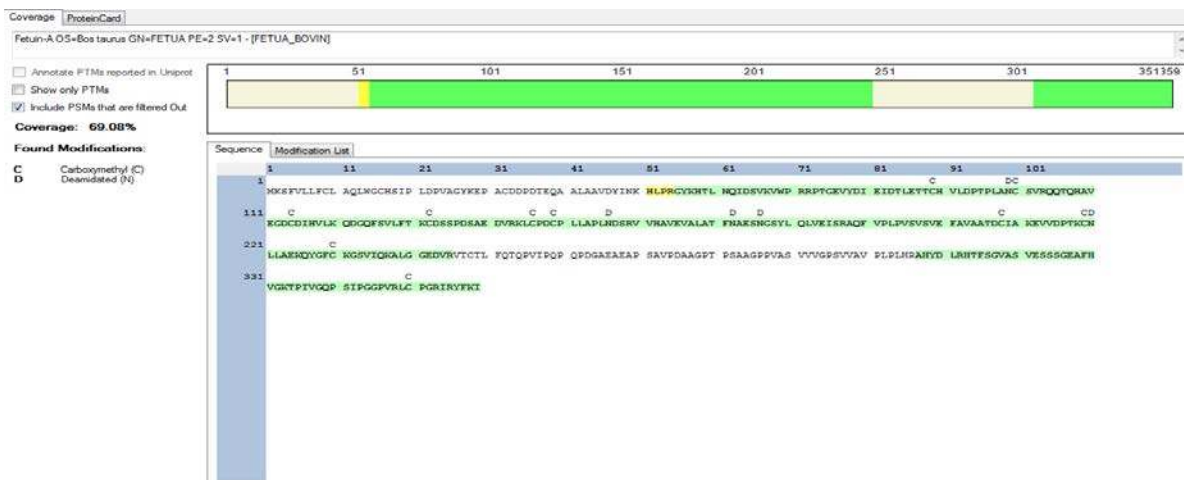
Best treff: grønn, Middel treff: gul, Dårlig treff: rød, Ingen treff: X

Fetuin A, ID: P12763	N-99	N-156	N-176	Antall påviste unike peptider	Score	Caoverage
Uten PNGase F-1-ms1	X	X	Grønn	31	1820,46	62,12%
Uten PNGase F-1-ms2	X	X	Grønn	36	2275,70	62,12%
Uten PNGase F-2-ms1	X	X	Grønn	32	1862,28	62,12%
Uten PNGase F-2-ms2	X	X	Grønn	31	2055,90	54,87%
Uten PNGase F-3-ms1	X	X	Grønn	37	1929,79	54,87%
Uten PNGase F-3-ms2	X	X	Grønn	32	1831,44	54,87%
Med PNGase F-1-ms1	Grønn	Grønn	Grønn	42	2754,81	75,21%
Med PNGase F-1-ms2	Grønn	Grønn	Grønn	36	3314,99	69,08%
Med PNGase F-2-ms1	Grønn	Grønn	Grønn	40	2734,54	75,21%
Med PNGase F-2-ms2	Grønn	Grønn	Grønn	41	2736,59	69,08%
Med PNGase F-3-ms1	Grønn	Grønn	Grønn	41	2646,29	75,21%
Med PNGase F-3-ms2	Grønn	Grønn	Grønn	40	2192,37	69,08%

Figur 14 og 15 viser en kjøring uten PNGase F og en kjøring med PNGase F. Fra både Tabell 15 og Figur 14 og 15 er det klart at PNGase F har fått en sikrere bekreftelse når den brukes. Dette skyldes høyest sannsynlig deglykosylering av AA 99, og AA 156. For å bekrefte dette ble MS/MS spekteret til de ulike kjøringene sammenlignet.

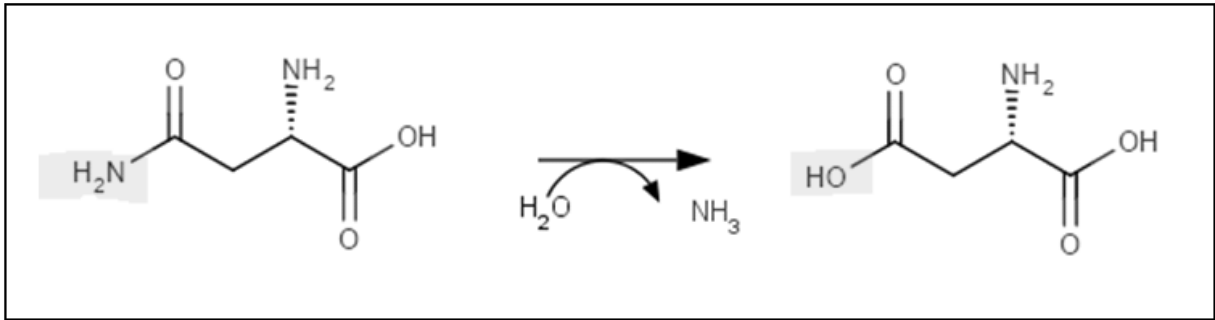


Figur 14- Peptidsekvenser til fetuin A fra en prøve ikke behandlet med PNGase F. Både N-99 og N-156 er ikke påvist.



Figur 15- Peptidsekvenser til fetuin A fra en prøve behandlet med PNGase F. både N-99 og N-156 er påvist med grønt farge.

Når PNGase F klipper karbohydrat delen ved asparagin aminosyrer (i tilfelle fetuin A Asn-99 og Asn-156) vil dette føre til hydrolyse av asparagin til asparaginsyre (Figur 16). Asparagin har en masse på 132 g/mol mens asparaginsyre har en masse på 133g/mol.

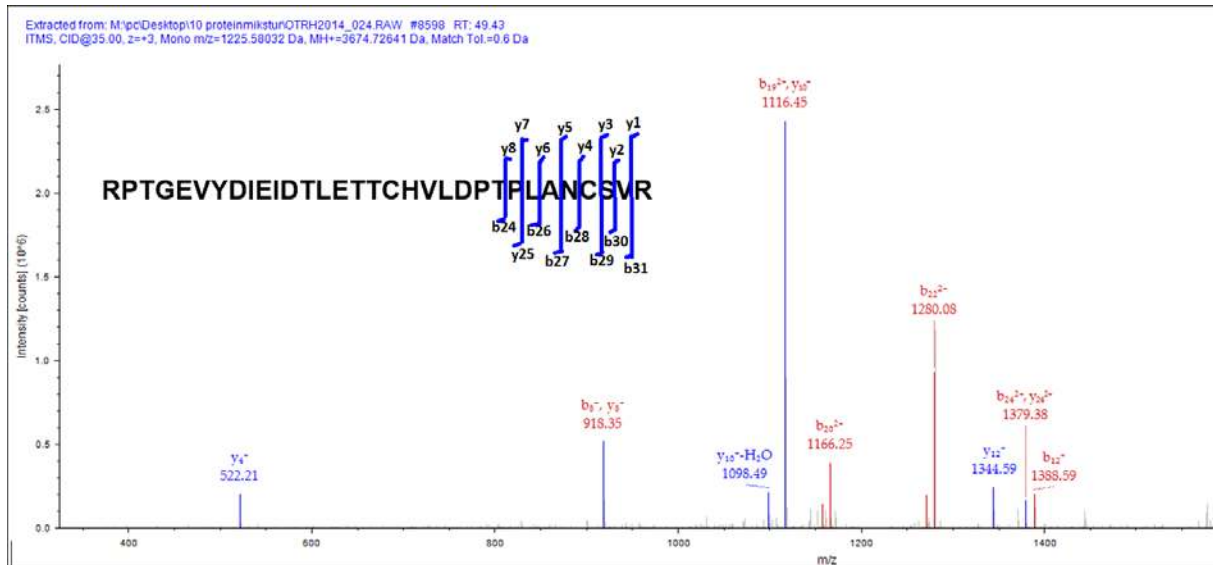


Figur 16- Asparagin aminosyre hydrolyserer til asparagin syre.(<http://www.chemicalize.org>).

Dette ble bekreftet ved å sammenligne eksperimentelle b- og y- ion fragmenter fra det deglykosylerte peptidet med b- og y- ion fragmenter i ProteinProspector databasen som er fra det glykosylerte peptidet.

5.1.1 N-deglykosylering bekreftelse av *RPTGEVYDIEIDTLETTCHVLDPTPLANCSVR*.

Figur 17 viser MS/MS spekteret av det tryptiske peptidet *RPTGEVYDIEIDTLETTCHVLDPTPLANCSVR* som oppstår etter deglykosylering og trypsinering. Sammenligning mellom de eksperimentelle b- og y- fragmenter (fra en deglykosylert peptid) og de teoretiske b- og y- fragmenter viste at deglykosylering har funnet sted på Asn-99. Figur 18 viser at y5 og b28 er uendret mens de eksperimentelle y5 og b28-ioner er en masseenheter høyere enn de teoretiske. Dette tyder på hydrolyse av Asn til Asp ($\Delta m+1$) og dermed deglykosylering.



Figur 17- MS/MS spekteret på b- og y-fragmenter til det tryptiske RPTGGEVDIEIDTLETTCHVLDPTPLANC VR sekvensen hvor N-99 er en del av sekvensen. Dette spekteret er et bevis på at peptidet er til stede i prøven.

Analytiske b- og y fragmentioner fra Proteome Discoverer

Ion Series	Neutral Losses	Precursor Ions				
#1	b ⁺	b ²⁺	Seq.	y ⁺	y ²⁺	#2
1	157.10840	79.05784	R			32
2	254.16117	127.58422	P	3518.61907	1759.81317	31
3	355.20885	178.10806	T	3421.56630	1711.28679	30
4	412.23032	206.61880	G	3320.51862	1660.76295	29
5	541.27292	271.14010	E	3263.49715	1632.25221	28
6	640.34134	320.67431	V	3134.45455	1567.73091	27
7	803.40466	402.20597	Y	3035.38613	1518.19670	26
8	918.43161	459.71944	D	2872.32281	1436.66504	25
9	1031.51568	516.26148	I	2757.29586	1379.15157	24
10	1160.55828	580.78278	E	2644.21179	1322.60953	23
11	1273.64235	637.32481	I	2515.16919	1258.08823	22
12	1388.66930	694.83829	D	2402.08512	1201.54620	21
13	1489.71698	745.36213	T	2287.05817	1144.03272	20
14	1602.80105	801.90416	L	2186.01049	1093.50888	19
15	1731.84365	866.42546	E	2072.92642	1036.96685	18
16	1832.89133	916.94930	T	1943.88382	972.44555	17
17	1933.93901	967.47314	T	1842.83614	921.92171	16
18	2094.95368	1047.98048	C-Carboxy...	1741.78846	871.39787	15
19	2232.01259	1116.50993	H	1580.77379	790.89053	14
20	2331.08101	1166.04414	V	1443.71488	722.36108	13
21	2444.16508	1222.58618	L	1344.64646	672.82687	12
22	2559.19203	1280.09965	D	1231.56239	616.28483	11
23	2656.24480	1328.62604	P	1116.53544	558.77136	10
24	2757.29248	1379.14988	T	1019.48267	510.24497	9
25	2854.34525	1427.67626	P	918.43499	459.72113	8
26	2967.42932	1484.21830	L	821.38222	411.19475	7
27	3038.46644	1519.73686	A	708.29815	354.65271	6
28	3153.49338	1577.25033	N-Deamid...	637.26103	319.13415	5
29	3314.50805	1657.75766	C-Carboxy...	522.23408	261.62068	4
30	3401.54008	1701.27368	S	361.21941	181.11334	3
31	3500.60850	1750.80769	V	274.18738	137.59733	2
32			R	175.11896	88.06312	1

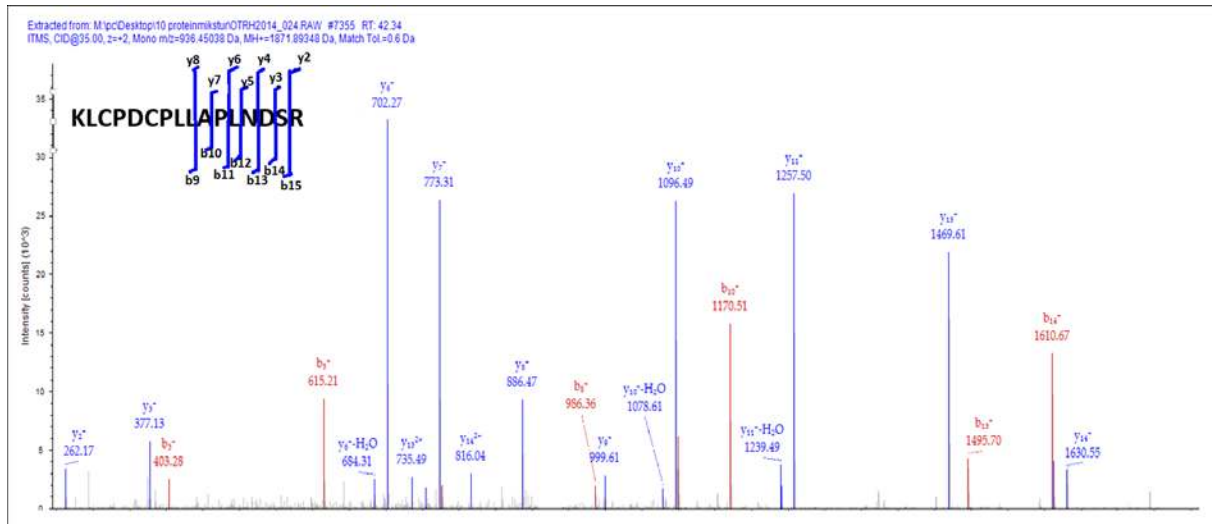
Teoretiske b- og y-fragmentioner fra ProteinProspector

b		y	
---	1	R	32
254.1612	2	P	31 3517.6349
355.2088	3	T	30 3420.5821
412.2303	4	G	29 3319.5345
541.2729	5	E	28 3262.5130
640.3413	6	V	27 3133.4704
803.4046	7	Y	26 3034.4020
918.4316	8	D	25 2871.3387
1031.5156	9	I	24 2756.3117
1160.5582	10	E	23 2643.2277
1273.6423	11	I	22 2514.1851
1388.6692	12	D	21 2401.1010
1489.7169	13	T	20 2286.0741
1602.8010	14	L	19 2185.0264
1731.8436	15	E	18 2071.9423
1832.8913	16	T	17 1942.8997
1933.9389	17	T	16 1841.8520
2094.9536	18	C(Carboxymethyl)	15 1740.8044
2232.0125	19	H	14 1579.7897
2331.0809	20	V	13 1442.7308
2444.1650	21	L	12 1343.6624
2559.1919	22	D	11 1230.5783
2656.2447	23	P	10 1115.5514
2757.2924	24	T	9 1018.4986
2854.3451	25	P	8 917.4509
2967.4292	26	L	7 820.3982
3038.4663	27	A	6 707.3141
3152.5092	28	N	5 636.2770
3313.5239	29	C(Carboxymethyl)	4 522.2341
3400.5559	30	S	3 361.2194
3499.6243	31	V	2 274.1874
---	32	R	1 175.1190

Figur 18- Forskjell i masse på +1 mellom eksperimentelle og teoretiske b- og y- ioner til RPTGGEVDIEIDTLETTCHVLDPTPLANC SVR sekvensen. Eksperimentelle ioner har +1 Da i masse etter deamidering/deglykosylering.

5.1.2 N-deglykosylering bekreftelse av *KLCPDCPLLAPLNSDR*

For *KLCPDCPLLAPLNSDR* er lignende bevisføring presentert i Figur 19 og 20. Her er y4 og b13-ionfragmenter som er lik når de eksperimentelle ioner sammenlignes med de teoretiske mens y4 og b13 har en masse økning på +1 Da, noe som tyder på deglykosylering.



Figur 19- MS/MS spekteret av b- og y- ioner for det tryptiske peptidet *KLCPDCPLLAPLNSDR* sekvensen, hvor N-156 er en del av sekvensen. Spekteret er et bevis på at peptidet er til stede i prøven.

Analytiske b- og y-fragmenter fra Proteome Discoverer

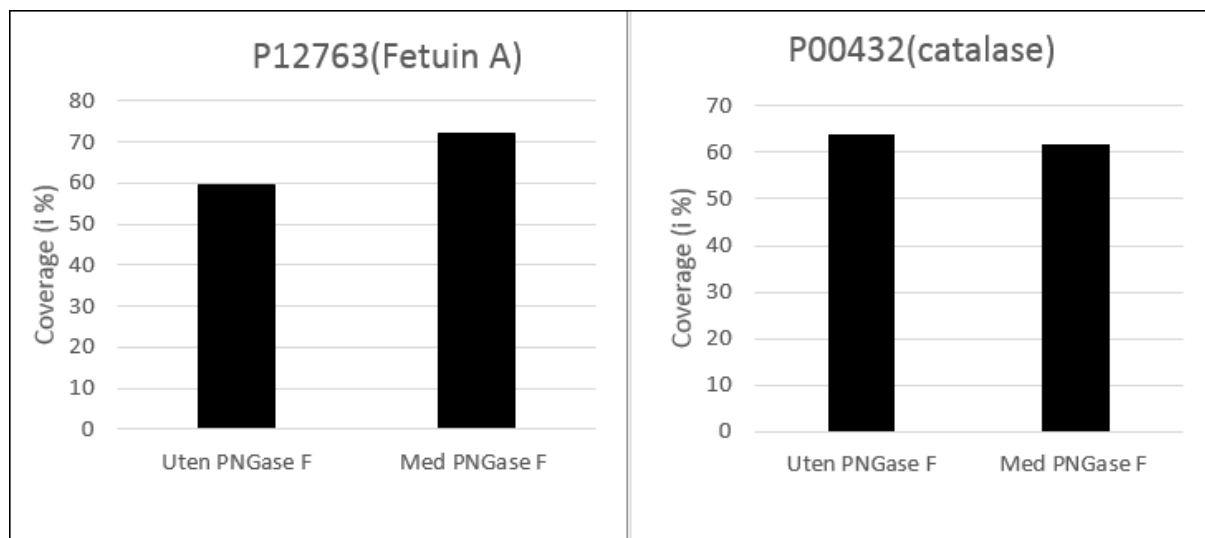
Teoretiske b- og y-fragmenter fra ProteinProspector

#1	b ⁺	b ²⁺	Seq.	y ⁺	y ²⁺	#2
1	129.10225	65.05476	K			16
2	242.18632	121.59680	L	1743.79289	872.40008	15
3	403.20099	202.10413	C-Carboxy...	1630.70882	815.85805	14
4	500.25376	250.63052	P	1469.69415	735.35071	13
5	615.28071	308.14399	D	1372.64138	686.82433	12
6	776.29537	388.65133	C-Carboxy...	1257.61443	629.31085	11
7	873.34814	437.17771	P	1096.59976	548.80352	10
8	986.43221	493.71975	L	999.54699	500.27713	9
9	1099.51628	550.26178	L	886.46292	443.73510	8
10	1170.55340	585.78034	A	773.37885	387.19306	7
11	1267.60617	634.30673	P	702.34173	351.67450	6
12	1380.69024	690.84876	L	605.28896	303.14812	5
13	1495.71719	748.36223	N-Deamid...	492.20489	246.60608	4
14	1610.74414	805.87571	D	377.17794	189.09261	3
15	1697.77617	849.39172	S	262.15099	131.57913	2
16			R	175.11896	88.06312	1

b		y	
---	1	K	16
242.1863	2	L	15
403.2010	3	C(Carboxymethyl)	14
500.2537	4	P	13
615.2807	5	D	12
776.2953	6	C(Carboxymethyl)	11
873.3481	7	P	10
986.4322	8	L	9
1099.5162	9	L	8
1170.5533	10	A	7
1267.6061	11	P	6
1380.6902	12	L	5
1494.7331	13	N	4
1609.7600	14	D	3
1696.7921	15	S	2
---	16	R	1

Figur 20- Forskjell i masse på +1 mellom eksperimentelle og teoretiske b- og y- ioner til *KLCPDCPLLAPLNSDR* sekvensen. Eksperimentelle ioner har +1 Da i masse etter deamidering/deglykosylering.

Figur 21 viser forskjellen mellom fetuin A som er (glykoprotein) og catalase (ikke-glykoprotein). Begge proteiner var behandlet med PNGase F, men kun fetuin A økte i coverage.



Figur 21- Forskjellen mellom et glykoprotein og et ikke-glykoprotein etter behandling med PNGase F.

5.2 Deglykosylering av eksosom standardløsning

Eksosomer er som nevnt små membran vesikler av størrelse 20-100 nm. De har sitt opphav fra endosomer og har dermed flere proteiner som inngår i membraner. Avhengig av den cellen de utskilles fra inneholder eksosomer ulike proteiner og RNA karakterisert til samme cellen. Slike proteiner og RNA kan både finnes inni eksosom lasterom «cargo» og på utsiden av membranen (membranproteiner) [32].

Omkring 30 % av naturlig forekommende proteiner er enten membran assosierte proteiner (hydrofilt) eller integrert membran proteiner (hydrofobt). Integrert membran proteiner er fullt integrert inni fosfolipidets dobbellag. Slike proteiner har en veldig viktig rolle i celle-celle interaksjoner, substrat transport og signal transduksjon. Membran proteiner har vist seg å være utfordrende å studere fordi slike proteiner er hydrofobe, ustabile og forekommer i lave mengder i cellen [61].

5.2.1 Deglykosylering av proteiner i eksosomer

Til dette forsøket ble det brukt lyofilisert eksosom standardløsning, ferdig isolert fra urin fra friske individer. Målet med dette forsøket var å deglykosylere proteiner i eksosomer og undersøke om dette gir høyere coverage og score av glykoproteiner. Det ble brukt 30µg vial av lyofilisert eksosom standardløsning. Disse eksosomene ble først løst i destillert vann, redusert med DTT og alkylert med IAA. Deretter ble løsningen fordelt på 4 paralleller med 7,5 µg i hvert, PNGase F enzymet ble tilsatt til to paralleller for å sammenligne prøvene med hverandre. Etter LC-MS analysen ble det gjennomgått alle identifiserte proteiner i Proteome Discoverer og uniprot databaser. Mens glykoproteiner ble undersøkt i begge databaser ble det fokusert på:

- velge proteiner med minst 2 unike peptider fra Proteome Discoverer.
- velge glykoprotein med N-linked glykosylering.
- antall treff, hvor mange N-linked ble påvist etter behandling med PNGase F.
- antall unike peptider før og etter behandling med PNGase F.
- score og coverage av glykoproteiner før og etter behandling med PNGase F.

De fleste identifiserte proteiner valgt med to unike peptider var membran glykoproteiner med én eller flere N-linked seter. Etter sammenligning av prøver var det både høye score og coverage på identifiserte proteiner i prøver behandlet med PNGase F. I tillegg resulterte dette til økt antall unike peptider (Tabell 16). Bevisføring for deglykosylering gjør på samme måte som beskrevet i 5.1.1 og 5.1.2.

Tabell 16 oversikt over endringer i antall unike peptider og coverage av glykoproteiner etter behandling med PNGase F.

Protein navn	Uniprot protein ID	Lokasjon	Antall N-glykoser	Påviste deglykosyleringer	Endring i unike peptider (gjennomsnitt)	Endring i coverage (gjennomsnitt)
Aminopeptidase N, ANPEP	P15144	Cellemembran, membran, cytoplasma	10	N-128 N-234 N-265 N-319 N-527 N625 N-681 N-735 N-818	+10,5	+4,22 %
Gamma-glutamyltranspeptidase 1	P19440	Cellemembran, membran	7	N-95 N-120 N-230 N-344 N-511	+4,25	+15 %
Semenogelin-2	Q02383	Sekrert	2	N-272	+18,5	+10,2 %
Thy-1 membrane glycoprotein	P04216	Cellemembran, membran	4	N-42, N-79	+1,25	+15,18
Podocalyxin	O00592-2	Cellemembran, membran	5	N-360	+3,25	+1,76
Pro-epidermal growth factor	P01133-2	Membran	9	N-104, N-404, N-596	+3	-0,7 %
Aquaporin-1	P29972	Cellemembran, membran	2	N-205 på begge prøver	0	+7,7 %

Olfactomedin-4	Q6UX06	Mitokondriet, sekret	3	N-72	+0,5	+ 2 %
----------------	--------	-------------------------	---	------	------	-------

Samtidig var noen glykoproteiner i prøven som ikke ble deglykosylert av PNGase F. For noen glykoproteiner førte ikke PNGase F til bedre resultater, slike glykoproteiner er nevnt i Tabell 17. Det kan tenkes at PNGase F deglykosylerer kun én aminosyre i hele proteinet, dermed fører dette ikke til betydelig forskjell. Særlig når proteinet er stort nok at en endring innen et peptid ikke fører til betydelig forskjell i coverage og score. En annen mulig forklaring kan være at det er stor heterogenitet på karbohydrat delen fra et glykoprotein til annet. For noen proteiner kan enzymet trypsin lett proteolyse proteinet etter deglykosylering fordi karbohydrater kan lett fjernes. Mens for andre proteiner er karbohydrat delen så kompleks at enzymet ikke får like bra tilgang for å proteolysere fordi karbohydrat delen ennå ikke fjernet fra proteinet.

Andre forklaringer er at andre faktorer kan spille inn og påvirke proteinets score og coverage slik som andre PTMs. Proteinene kan også være i lave mengder i prøven.

Tabell 17 oversikt over endringer i antall unike peptider og coverage av glykoproteiner etter behandling med PNGase F.

Protein navn	Uniprot protein ID	Lokasjon	Antall N-glykoseter	Påviste deglykosyleringer	Endring i unike peptider (gjennomsnitt)	Undring i coverage (gjennomsnitt)
Solute carrier family 2	P22732	Cellemembran, membran	1	X	0	-3,3 %
Prostatic acid phosphatase	P15309	Cellemembran, sekret, lysosomer, amyloid	3	N-94	0	0 %

Solute carrier family 12 member 1	Q13621	Membran	2	X	-0,5	-6,2 %
Dipeptidase 1	P16444	Cellemembran, membran	4	N-57 N-279 N-332 N-358	+7,75	-4,16 %
Galectin-3-binding protein	Q08380	Ekstracellulær matriks, sekret	7	N-69, N-398, N-580	+1,5	-8,6 %
Neprilysin	P08473	Cellemembran, membran	4	N-145 N-325	0	-11,89 %
Dipeptidyl peptidase 4	P27487	Cellemembran, membran, sekret, celle junction	9	N-150	+0,5	-11,33 %
Xaa-Pro aminopeptidase 2	O43895	Cellemembran, membran	5	N-49	0	-9 %
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P62937	Cytoplasma, sekret	1	X	0	-2,44
Uromodulin	P07911-4	Cellemembran, membran, sekret, cilium	7	X	+3,68	0 %
Ammonium transporter Rh type C	Q9UBD6	Cellemembran, membran	1	X	-1	-7,12 %
CD59 glycoprotein	P13987	Cellemembran, membran, sekret	1	X	1,25	0 %
Kininogen-1 (Isoform 2)	P01042-2	Sekret	4	X	0	-7 %

CD9 antigen	P21926	Cellemembran, membran	2	X	0	1 %
Vasorin	Q6EMK4	Membran, sekret	5	N-500 N-528	+1	-1,6 %
Transmembrane protease serine 2	O15393	Cellemembran, membran, sekret	2	X	-0,5	-5 %
Uroplakin-2	O00526	Cellemembran, membran	3	X	-0,5	-3 %
G-protein coupled receptor family C group 5 member B	Q9NZH0	Cellemembran, Membran	1	X	+0,25	-0,11 %

5.2.2 Deglykosylering av et «større» mengde protein eksosomer

I dette forsøket ble det brukt 2x30µg eksosom standardløsning. Løsningen ble redusert med DTT, alkylert med IAA og trypsinert. Så ble mengden i vialene fordelt på 6 paralleller med 10 µg per prøve. Eksosomer ble proteolysert av trypsin i vanlig buffer uten å åpne dem. Derfor er det usikkert hvor mye protein det er forbundet med den ytre membranen og hvor mye, det er av hvert protein. Hensikten med å bruke større mengde eksosomer var dermed å se om det blir flere proteintreff og høyere coverage på proteiner.

Etter LC-MS analysen ble det benyttet samme betingelser for søking av glykoproteiner som forrige metoder. Resultatene viste seg å være bedre enn når det ble brukt mindre mengder eksosomer per prøve. Det ble identifisert flere glykoproteiner med både høyere coverage og score. I tillegg ble det påvist flere unike peptider (Tabell 18). Noe som tyder på at større mengder membranproteiner var tilgjengelig for deglykosylering per prøve. Dermed ble flere membranproteiner identifisert med flere unike peptider per protein, i tillegg til både høyere score og coverage.

Tabell 18 oversikt over endringer i antall unike peptider og coverage av glykoproteiner etter behandling med PNGase F.

Protein navn	Uniprot protein ID	Lokasjon	Antall N-glykoseter	Påviste deglykosyleringer	Endring i unike peptider (gjennomsnitt)	Endring i coverage (gjennomsnitt)
Prominin-2	Q8N271 Q8N271-2	Cellemembran, membran	1	N-270	+2	+12 %
Thy-1 membrane glycoprotein	P04216	Cellemembran, membran	4	N-42, N-79, N-119,	+2,8	+40,37 %
Olfactomedin-4	Q6UX06	Mitokondriet, sekret	3	N-72	+2	+8 %
Prostatic acid phosphatase	P15309	Cellemembran, sekret, lysosomer, membranen	3	N-94, N-220	+2,7	+ 7,7 %
Galectin-3-binding protein	Q08380	Ekstrasellulær matriks, sekret.	7	N-69, N-125, N-192, N-362, N- 398, N-551, N-580	+4,44	+10 %

Glutamyl aminopeptidase	Q07075	Membran	14	N-124, N-324, N-607, N-610, N-678, N-763, N-773, N-801, N-828	+ 2,6	+8 %
Dipeptidase 1	P16444	Cellemembran, membran	4	N-57, N-279, N-332, N-358	+ 5	+ 15 %
Aminopeptidase N	P15144	Cellemembran, cytoplasma, membran	10	N-128, N234, N-265, N319, N-527, N-573, N625, N-681, N-735, N-818	+15	+ 27 %
Neprilysin	P08473	Cellemembran, membran	4	N-145, N-285	+ 0,8	+ 1,4 %
Plasma serine protease inhibitor	P05154	Sekret	3	N-262	+ 0,2	+8, 5 %
Vasorin	Q6EMK4	Membran, sekret	5	N-117, N-273, N-528	+ 0,5	+ 6 %

Gamma-glutamyltranspeptidase 1	P19440	Cellemembran, membran	7	N-120, N-230, N-266, N-297, N-344, N-511	+ 6	+21 %
Dipeptidyl peptidase 4	P27487	Cellemembran, membran, sekret, cell junction,	9	N-150 N-321 N-520 N-685	+ 4	+10 %
Prolactin-inducible protein	P12273	Sekret	1	N-105 *	+3	+2 %
Kininogen-1	P01042-2	Sekret	4	N-205* N-294	0	+ 8 %
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	P11279	Cellemembran, membran, lysosomer, endosomer	11	N-37, N-45, N-62*, N-84, N-103, N-107, N-121, N-130	+2,11	+10,55 %
Polymeric immunoglobulin receptor	P01833	Cellemembran, membran, sekret	7	N-83, N-90, N-186, N-421	+ 0,8	+2 %
Ig alpha-1 chain C region	P01876	Eksosomer i tillegg til andre steder	2	N-144	+0,1	+ 4 %

Angiotensin-converting enzyme	P12821	Cellemembran, membran, sekret, cytoplasma	15	N-111, N-146, N-160, N-445, N-695, N-714, N-760, N-942	+3	+11,3 %
Semenogelin-2	Q02383	Sekret	1	N-272	+ 5	+ 2 %
Basal cell adhesion molecule	P50895	Membran	5	N-377, N-383, N-439	+1	+10 %
Aquaporin-1	P29972	Cellemembran, membran	2	N-205 for alle prøver	+0,2	-2,4 %
Alpha-1-antitrypsin	P01009	Endoplasmatisk-retikulum, ekstra celleulær matriks,	3	N-107	+ 0,5	+ 11 %
Choline transporter-like protein 4	Q53GD3-3	Membran	7	N-69. N-155	+1,1	+9, 35
Carboxypeptidase M	P14384	Cellemembran, membran	5	N-38, N-115 N-363 N-	+1,12	+12 %

				384		
--	--	--	--	-----	--	--

Tabell 19 viser oversikt over glykoproteiner som ikke ble deglykosylert av PNGase F.

Tabellen viser også deglykosylerte proteiner hvor PNGase F ikke føret til noen endringer på proteinet. Mulige forklaringer på dette ble beskrevet under 5.2.1.

Tabell 19 oversikt over endringer i antall unike peptider og coverage av glykoproteiner etter behandling med PNGase F.

Protein navn	Uniprot protein ID	Lokasjon	Antall N-glykoser	Påviste deglykosyleringer	Endring i unike peptider (gjennomsnitt)	Endring i coverage (gjennomsnitt)
Uroplakin-2	O00526	Cellemembran, membran	3	X	0	-0,8 %
Xaa-Pro aminopeptidase 2	O43895	Cellemembran, membran	5	N-35, N-49	-0,6	- 4 %
Solute carrier family 12 member 1	Q13621	Membran	2	X	-1,77	- 3,5 %
CD9 antigen	P21926	Cellemembran, membran	2	X	+ 0,7	-3 %
Aquaporin-2	P41181	Cellemembran, golgiapparat, membran	1	X	-0,2 %	-2,2 %
Mannosyl-oligosaccharidase 1,2-alpha-mannosidase	P33908	Golgiapparat, membran	1	N-513* på begge prøver	-0,44	-0,3 %

IA						
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P62937	Cytoplasma, sekret	1	X	+0,1	-3 %
Prostate stem cell antigen	O43653	Cellemembran, membran	3	X	+0,8	-3,7 %
Multidrug resistance protein 1	P08183	Cellemembran, membran	3	N-99 påvist i alle prøver	-0,2	+0,3 %
CD59 glycoprotein	P13987	Cellemembran, membran, sekret	1	X	+0,1	0 %
Ammonium transporter Rh type C	Q9UBD6	Cellemembran, membran	1	X	+0,4	-1,1 %
G-protein coupled receptor family C group 5 member C	Q9NQ84	Cellemembran, membran, cytoplasmatisk vesikler	1	X	+0,44	-1,4 %
Transmembran e protease serine 2	O15393	Cellemembran, membran, sekret	2	X	+1	+1,4

Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5	P22732	Cellemembran, membran	1	X	-0,5	-4.43
Integral membrane protein 2B	Q9Y287	Cellemembran, endosomer, golgiapparat, membran, sekret	1	X	-0,7	-2,5 %
G-protein coupled receptor family C group 5 member B	Q9NZH0	Cellemembran, membran, cytoplasmatisk vesikler	1	X	0	-1,65
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P62937	Cytoplasma, sekret	1	X	0	-4 %
Prostasin	Q16651	Cellemembran, membran, sekret	1	X	0	+6 %

5.3 Isolering av eksosomer fra urin

Etter å ha vist at prosedyren av både deglykosylering og trypsinering fungerte på eksosomer (standarder), ble prøve kompleksiteten økt til eksosomer i urin.

Ved urinanalyse er det vanlig å samle morgenurin fordi det er mest konsentrert og spormengder av proteiner kan oppdages. Samlet morgenurin fra friske individer ble brukt for isolering av eksosomer i denne oppgaven.

5.3.1 Bruk av 5 kDa, 100 kDa og 1000 KDa filter

Ved bruk av 5 kDa filter ble morgenurin sentrifugert, supernatanten filtrert og sentrifugert igjen til et sluttvolum på 200 μ L. Dette volumet ble tilsatt tris-HCl/NaCl buffer. Prøvene ble redusert med DTT og alkylert med IAA. Det ble laget 6 paralleller hvor PNGase F ble tilsatt til 3 paralleller.

Ved bruk av 1000 kDa filter ble morgenurin sentrifugert. Eksosom standardløsning ble tilsatt til 2 rør med urin. Deretter ble prøvene filtrert og sentrifugert til et sluttvolum på 200 μ l. Dette volumet blandes med HCl/NaCl buffer, redusert med DTT og alkylert med IAA. Det ble laget 12 paralleller hvor PNGase ble tilsatt til 3 rør med urin og til 3 rør med urin spiked eksosom standardløsning.

Mens ved bruk av 100 KDa filterble ble morgenurin sentrifugeres ved en større hastighet. Deretter ble supernatanten behandlet på samme måte som ved bruk av 1000 kDa filter.

Hensikten med å bruke membraner med forskjellige porestørrelser:

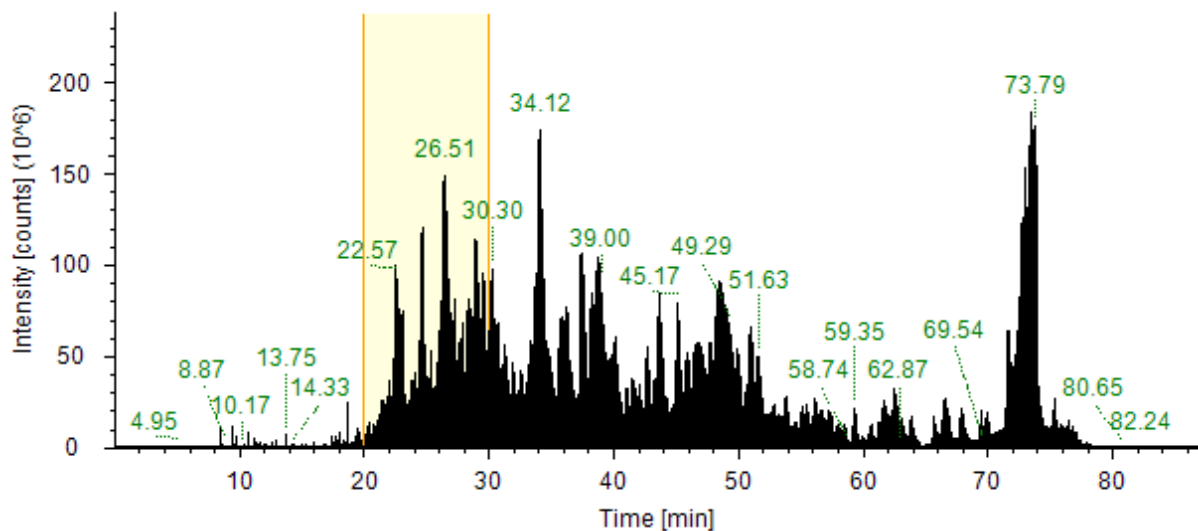
- 5 kDa filter for isolering av urinproteiner, deretter å undersøke om PNGase F vil føre til bedre protein identifisering av isolerte proteiner.
- 100 KDa filter for isolering av eksosomer fra urin, deretter å undersøke om PNGase F fører til bedre identifisering av proteiner i eksosomer.
- 1000 KDa filter for å isolere eksosomer fra urin, minimere interferens av tallrike proteiner i prøven. Deretter å undersøke om PNGase F vil føre til bedre identifisering av proteiner i eksosomer.

Etter LC-MS analysen viser kromatogrammet fra rå filer fra Xcalibur programmet høye topper med to og tre ladete peptider. Et eksempel på et slikt kromatogram er vist i Figur 22. Det er tydelig mange topper i kromatogrammet samt høyt intensitet på dem. For å sammenligne eksperimentelle data med teoretiske data ble rå filer overført til Proteome Discoverer programmet hvor SEQUEST ble brukt som søkealgoritme. Etter sammenligning ble få peptider observert med lite treff og score fra de nevnte isoleringer. Selv om kromatogrammet inneholdt mange topper.

Ved søking av data i Proteome Discoverer ble flere innstillinger endret for å se om dette kunne vise protein treff:

- Det ble prøvd å søke data analysert på kun 10 minutter for å undersøke om programmet klarer å filtrere mindre data bedre (Figur 22).
- Det ble prøvd å øke *Precursor mass Tolerance* fra 10-40 ppm (i tilfelle at MS kalibreringer ikke var gode nok). Dette ble prøvd for å tillatte et større avvik i masse for eksperimentelle peptider fra den teoretiske verdien.

Endring av innstillinger i programmet førte allikevel ikke til bedre proteintreff.



Figur 22- Viser kromatogrammet fra en urinprøve hvor det ble prøvd å analysere kun 10 minutters data.

Forsøkene under kapitel 5.1 og 5.2 ga resultater som tyder på deglykosylering og økt sikkerhet i protein identifisering. Til disse forsøkene ble det brukt mobilfaser som bestod av acetonitril, DMSO og maursyre. Derfor ble det bestemt å bruke samme mobilfase

sammensetning for isolering av eksosomer fra urin. Når 5 kDa 1000 kDa filter ble brukt ga metoden som nevnt ikke noen resultater. En mulig forklaring var at DMSO førte til endring på noen PTMs, samtidig var det vanskelig å vite hvor DMSO binder seg til peptidet og hvilke endringer vil dette føre til. En annen forklaring var at eksosomer ble filtrert gjennom 1000 kDa filter fordi det var store porer på filteret. Elektrommikroskopi (EM) utført av stipendiat Siri Hildonen bekreftet at det var få partikler av nm størrelse i prøven. Derfor ble det bestemt å gjenta forsøket med filtrering av urin (n=12 paralleller), men bruke et filter med mindre porestørrelse (100 kDa) og i tillegg ekskludere DMSO fra mobilfasene.

Selv om DMSO ble ekskludert, og type filter ble endret førte dette ikke til bedre LC-MS/MS resultater, derimot kunne det observeres vesikler som korresponderer med størrelse på eksosomer (fra 20-30 nm) i prøvene (EM utført av Siri Hildonen). Store datamengder har blitt observert, kromatogrammer med mange høye, tette topper og flere ladete peptider, men veldig få proteiner har blitt funnet ved søking i Proteome Discoverer.

Det ble derfor diskutert på muligens hvorfor det ikke ble observert datatreff og eventuelt forbedring i prosedyren for å unngå dette.

Ved å sammenligne kromatogrammer fra de forsøkene beskrevet i 5.1 og 5.2 (Figur 23 og 24) med urinprøvene, (se Figur 25-29) ser vi en klar forskjell. Kromatogrammet fra 10-proteinmikstur (Figur 23) viser fine separerte topper, mens kromatogrammet fra urinprøven, (for eks. Figur 25) viser veldig mange tettbundet-topper. Derfor kan det tenkes kromatogrammene inneholder mye data og dermed ikke kan tolkes. Eller at ekskluderings tiden på MS kan være for kort og at dermed få peptider ved høy konsentrasjoner bli detektert.

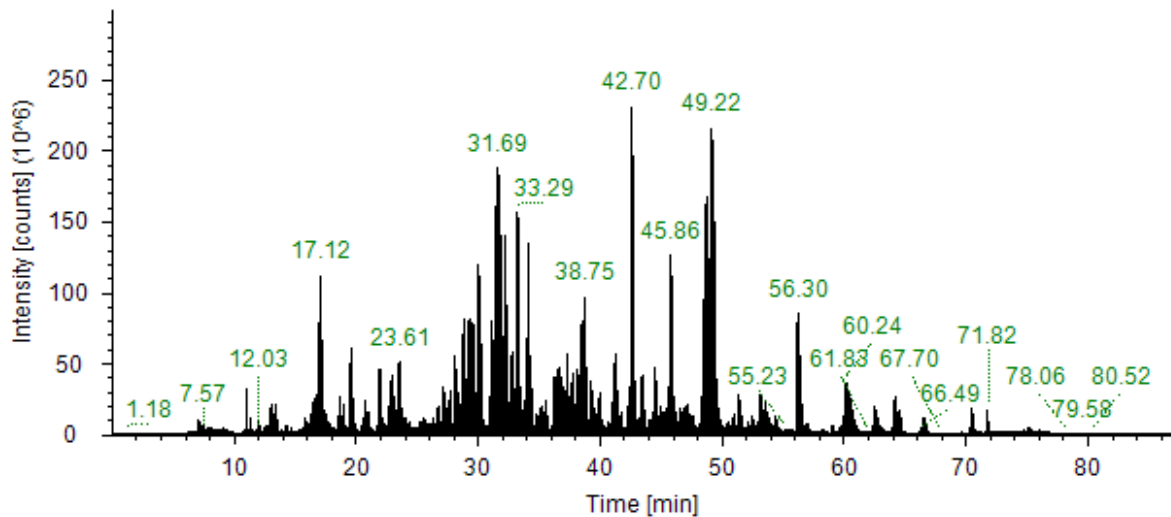
Mulige forbedringer i kromatografi for å løse dette kan være 2-D-kromatografi eller lengere gradienter.

2-D-kromatografi

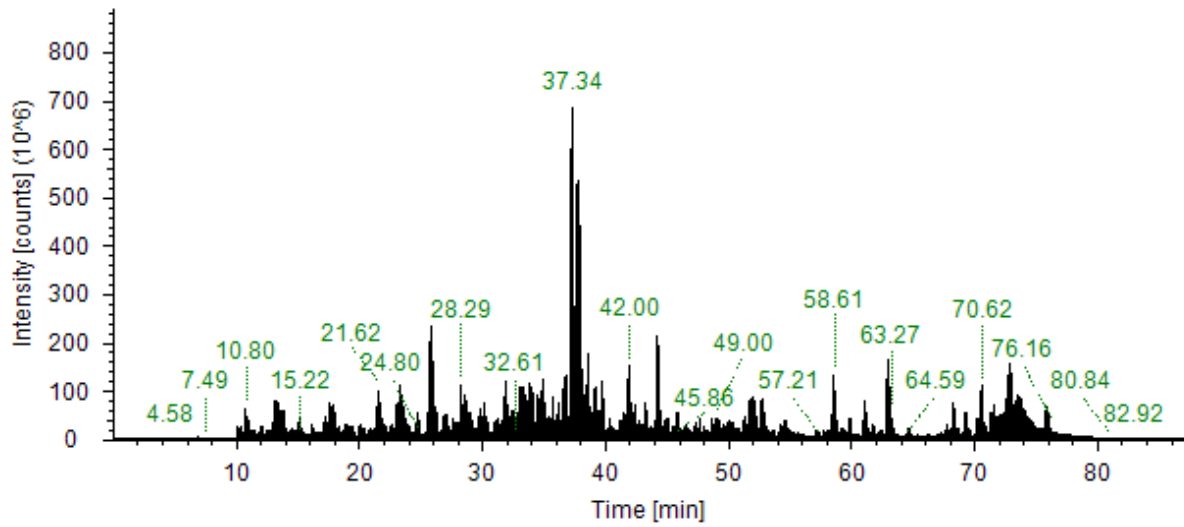
En 2-dimensjonal kromatografi baserer seg på forskjellige separasjonsmekanismer. Det finnes metoder hvor den første dimensjonen separerer peptider etter hydrofile egenskaper mens den andre dimensjonen separerer peptider etter hydrofobe egenskaper. På denne måten vil det føre til bedre separasjon særlig når prøven inneholder høye proteinmengder. I et slikt tilfelle kan 2-dimensjonal kromatografi være et bedre alternativ enn en dimensjon kromatografi.

Benytte en lengre HPLC gradient

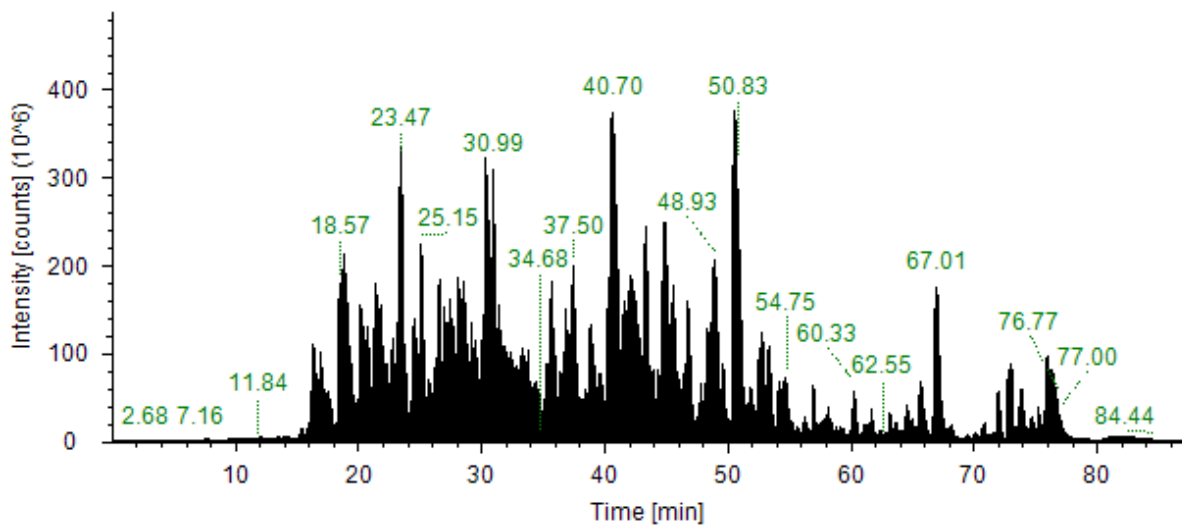
LC-metoden som ble benyttet i denne oppgaven hadde en analysetid på 90 minutter per prøve. Det kan være at de oppkonsentrerte urinprøvene basert på molekylvekt var for komplekse for en analysetid på 90 minutter ved at det ble for mange koeluerende peptider. Videre forsøk bør benytte en lengre gradient for å undersøke om peptider separeres bedre og at en får flere proteinidentifikasjoner.



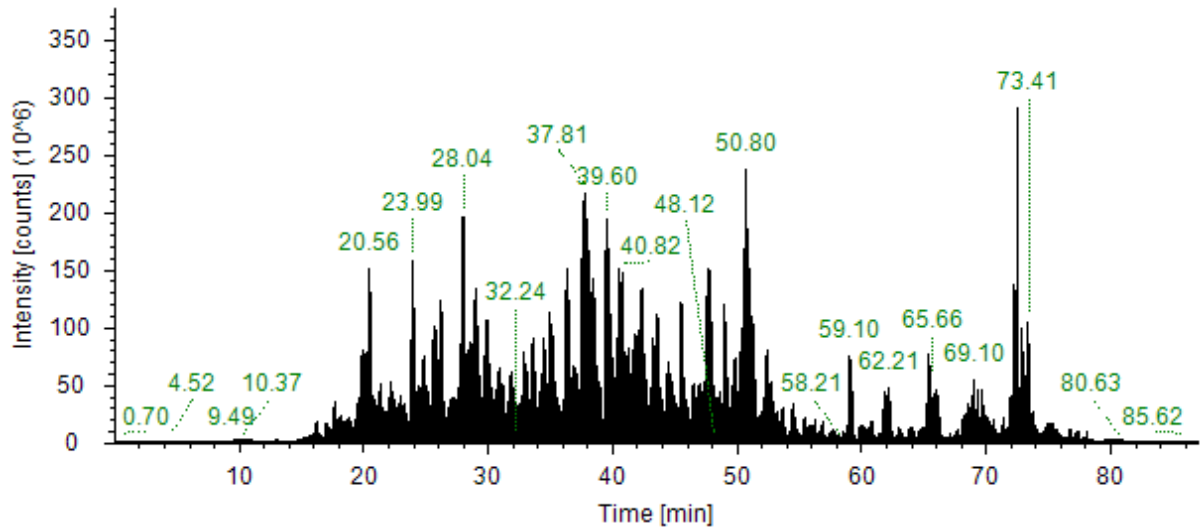
Figur 23- Viser kromatogrammet til en prøve av til 10-proteinmikstur.



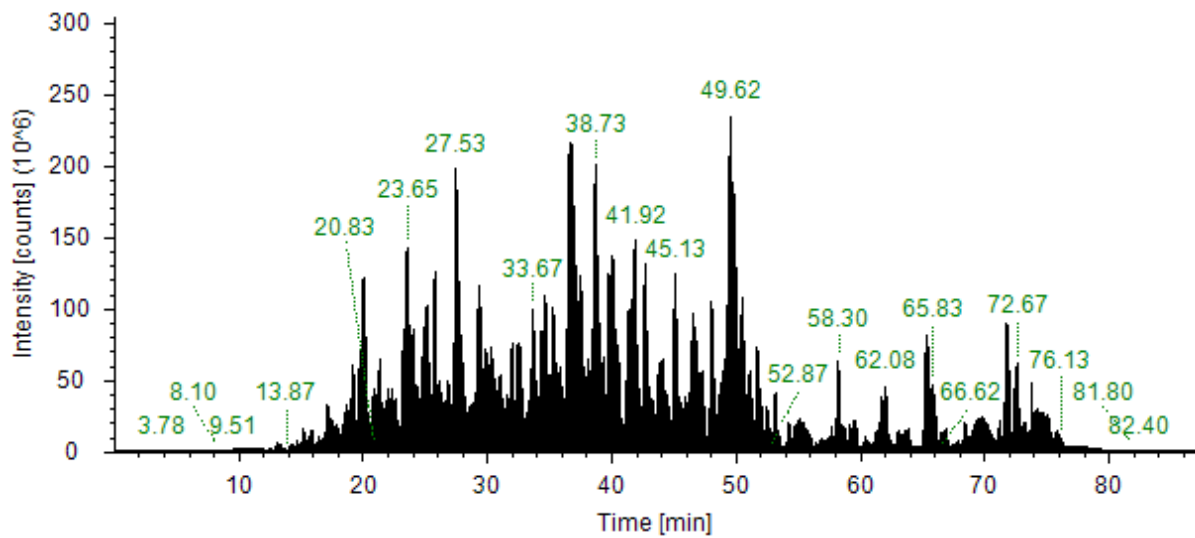
Figur 24- Viser kromatogrammet til en prøve fra eksosom standardløsning.



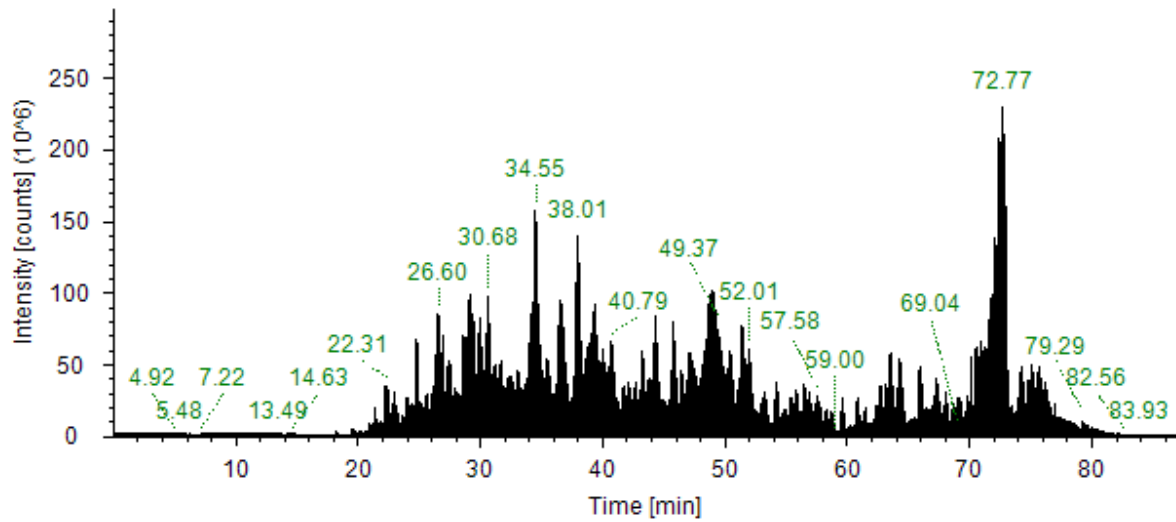
Figur 25- Viser kromatogrammet av en urinprøve behandlet med PNGase F (bruk av 5 kDa filter).



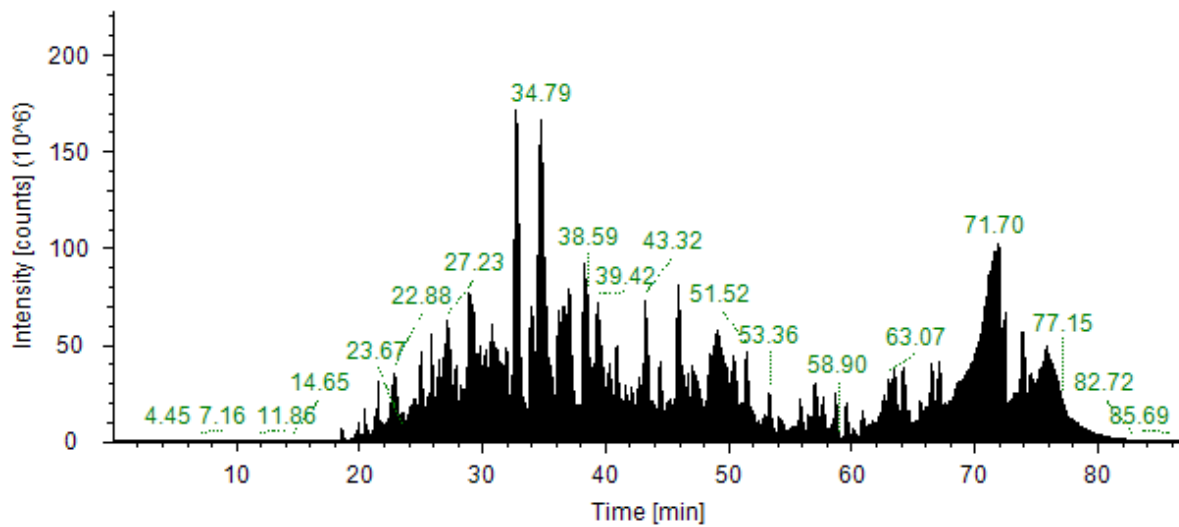
Figur 26- Viser kromatogrammet av en urinprøve behandlet med PNGase F (bruk av 1000 kDa filter).



Figur 27- Viser kromatogrammet av en urinprøve tilsatt eksosom standardløsning behandlet med PNGase F (bruk av 1000 kDa filter).



Figur 28- Viser kromatogrammet av en urinprøve behandlet med PNGase F (bruk av 100 kDa filter).



Figur 29- Viser kromatogrammet av en urinprøve tilsatt eksosom standardløsning behandlet med PNGase F (bruk av 100 kDa filter).

6 Konklusjon

En bottom-up metode ble brukt for analyse av proteiner i denne oppgaven. Proteiner ble proteolysert til peptider ved hjelp av enzymet trypsin. PNGase F ble brukt ved alle forsøk for deglykosylering av N-glykaner. 10-protein mikstur, eksosom standardløsning, og eksosomer isolert fra urin ble behandlet med PNGase F. Det viste seg at PNGase F deglykosylerte to av tre mulige N-glykosylerings seter i Fetuin A. Dette har blitt bevist ved hjelp av MS/MS spekteret av de tryptiske peptider *RPTGEVYDIEIDTLETTCHVLDPT PLANCSVR* (Asn-99) og *KLCPDCPLLAPLNSR* (Asn-156). En forskjell i masse på +1 Da ble observert ved fragmenter når PNGase F ble brukt. Masseforskjellen på +1 Da skyldes hydrolyse av asparagin til asparagin syre når det deglykosyleres av PNGase F. I tillegg til dette økte sikkerheten i protein identifisering (økt coverage og antall unike peptider per protein).

PNGase F førte på samme måte til bedre identifisering av veldig mange proteiner i eksosom standarder. De fleste av disse proteiner var enten membran assosierte eller membranproteiner.

Isolering av proteiner og eksosomer ved hjelp av 5 kDa, 100 kDa og 1000 kDa viste derimot få proteintreff (med eller uten PNGase F). Dette tross at det er mange peptidtopper i kromatogrammet.

Litteraturliste

1. Drabovich, A.P., et al., *Proteomic and Mass Spectrometry Technologies for Biomarker Discovery*. 2013. 17-37.
2. Matt, P., et al., *Biomarker discovery: proteome fractionation and separation in biological samples*. *Physiol Genomics*, 2008. **33**(1): p. 12-7.
3. Wu, J., Y.D. Chen, and W. Gu, *Urinary proteomics as a novel tool for biomarker discovery in kidney diseases*. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2010. **11**(4): p. 227-37.
4. Hortin, G.L. and D. Sviridov, *Diagnostic potential for urinary proteomics*. *Pharmacogenomics*, 2007. **8**(3): p. 237-55.
5. Ryan, D., et al., *Recent and potential developments in the analysis of urine: a review*. *Anal Chim Acta*, 2011. **684**(1-2): p. 8-20.
6. Han, X., A. Aslanian, and J.R. Yates, 3rd, *Mass spectrometry for proteomics*. *Curr Opin Chem Biol*, 2008. **12**(5): p. 483-90.
7. Chen, C.H., *Review of a current role of mass spectrometry for proteome research*. *Anal Chim Acta*, 2008. **624**(1): p. 16-36.
8. Hildonen, S., T.G. Halvorsen, and L. Reubsaet, *Why less is more when generating tryptic peptides in bottom-up proteomics*. *Proteomics*, 2014.
9. Zhang, Y., et al., *Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics*. *Chem Rev*, 2013. **113**(4): p. 2343-94.
10. Liebler, D.C., *Introduction to proteomics: tools for the new biology*. 2002, Totowa, N.J: Humana Press.
11. Pisitkun, T., R. Johnstone, and M.A. Knepper, *Discovery of urinary biomarkers*. *Mol Cell Proteomics*, 2006. **5**(10): p. 1760-71.
12. Sand, O., *Menneskets fysiologi*. 1 utg, 1 opplag. ed, ed. E. Haug, Ø.V. Sjaastad, and K.C. Toverud. 2001, Oslo: Gyldendal akademisk.
13. Rai, A.J., *The urinary proteome: methods and protocols*. 2010, Humana Press: Totowa, N.J.
14. Olszowy, P. and B. Buszewski, *Urine sample preparation for proteomic analysis*. *J Sep Sci*, 2014.
15. *Essential cell biology*. 2nd ed. ed, ed. B. Alberts. 2004, New York: Garland Science.
16. Nelson, D.L., *Lehninger principles of biochemistry*. 4th ed. ed, ed. M.M. Cox and A.L. Lehninger. 2004, New York: Worth Publishers.
17. Mann, M. and O.N. Jensen, *Proteomic analysis of post-translational modifications*. *Nat Biotechnol*, 2003. **21**(3): p. 255-61.
18. Thaysen-Andersen, M. and N.H. Packer, *Advances in LC-MS/MS-based glycoproteomics: Getting closer to system-wide site-specific mapping of the N- and O-glycoproteomes*. *Biochim Biophys Acta*, 2014.
19. Bunkenborg, J., et al., *Screening for N-glycosylated proteins by liquid chromatography mass spectrometry*. *Proteomics*, 2004. **4**(2): p. 454-65.
20. Imperiali, B. and S.E. O'Connor, *Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure*, in *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1999. p. 643-649.
21. Alavi, A. and J.S. Axford, *Sweet and sour: the impact of sugars on disease*. *Rheumatology (Oxford)*, 2008. **47**(6): p. 760-70.

22. Chen, W., J.M. Smeekens, and R. Wu, *Comprehensive analysis of protein N-glycosylation sites by combining chemical deglycosylation with LC-MS*. J Proteome Res, 2014. **13**(3): p. 1466-73.
23. Darville, L.N.F., M.E. Merchant, and K.K. Murray, *A mass spectrometry approach for the study of deglycosylated proteins*. Microchemical Journal, 2011. **99**(2): p. 309-311.
24. Vlassov, A.V., et al., *Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1820**(7): p. 940-8.
25. Bellingham, S.A., et al., *Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases?* Front Physiol, 2012. **3**: p. 124.
26. Pham, M.D., et al., *Improved mass spectrometric analysis of membrane proteins based on rapid and versatile sample preparation on nanodiamond particles*. Anal Chem, 2013. **85**(14): p. 6748-55.
27. Tan, S., H.T. Tan, and M.C. Chung, *Membrane proteins and membrane proteomics*. Proteomics, 2008. **8**(19): p. 3924-32.
28. Lynch, S., et al., *Novel MHC class I structures on exosomes*. J Immunol, 2009. **183**(3): p. 1884-91.
29. Simpson, R.J., et al., *Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential*. Expert Rev Proteomics, 2009. **6**(3): p. 267-83.
30. Wang, D. and W. Sun, *Urinary extracellular microvesicles: isolation methods and prospects for urinary proteome*. Proteomics, 2014. **14**(16): p. 1922-32.
31. Cheruvanky, A., et al., *Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **292**(5): p. F1657-61.
32. Raposo, G. and W. Stoorvogel, *Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends*. J Cell Biol, 2013. **200**(4): p. 373-83.
33. Turturici, G., et al., *Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages*. Am J Physiol Cell Physiol, 2014. **306**(7): p. C621-33.
34. Tamai, K., et al., *Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **399**(3): p. 384-90.
35. Edgar, J.R., E.R. Eden, and C.E. Futter, *Hrs- and CD63-dependent competing mechanisms make different sized endosomal intraluminal vesicles*. Traffic, 2014. **15**(2): p. 197-211.
36. Trajkovic, K., et al., *Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes*. Science, 2008. **319**(5867): p. 1244-7.
37. Yu, X., S.L. Harris, and A.J. Levine, *The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein*. Cancer Res, 2006. **66**(9): p. 4795-801.
38. Mathivanan, S., H. Ji, and R.J. Simpson, *Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication*. J Proteomics, 2010. **73**(10): p. 1907-20.
39. van Balkom, B.W., et al., *Exosomes and the kidney: prospects for diagnosis and therapy of renal diseases*. Kidney Int, 2011. **80**(11): p. 1138-45.
40. Mulcahy, L.A., R.C. Pink, and D.R. Carter, *Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake*. J Extracell Vesicles, 2014. **3**.
41. Rabinowits, G., et al., *Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer*. Clin Lung Cancer, 2009. **10**(1): p. 42-6.
42. E, Z., et al., *Therapeutic uses of exosomes*. Exosomes and Microvesicles, 2013: p. 1.
43. Fleury, A., M.C. Martinez, and S. Le Lay, *Extracellular vesicles as therapeutic tools in cardiovascular diseases*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 370.

44. Switzar, L., M. Giera, and W.M.A. Niessen, *Protein digestion: An overview of the available techniques and recent developments*. 2013. p. 1067-1077.
45. Pedersen-Bjergaard, S., *Legemiddelanalyse*. 2. utg. ed, ed. K.E. Rasmussen. 2010, Bergen: Fagbokforl.
46. Loftheim, H., et al., *2-D hydrophilic interaction liquid chromatography-RP separation in urinary proteomics--minimizing variability through improved downstream workflow compatibility*. *J Sep Sci*, 2010. **33**(6-7): p. 864-72.
47. van den Broek, I., et al., *Quantitative bioanalysis of peptides by liquid chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008. **872**(1-2): p. 1-22.
48. Banerjee, S. and S. Mazumdar, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte*. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012. **2012**.
49. Hansen, S., *Introduction to pharmaceutical chemical analysis*, ed. S. Pedersen-Bjergaard and K.E. Rasmussen. 2012, Chichester: Wiley.
50. Kebarle, P. and U.H. Verkerk, *Electrospray: From Ions in solution to Ions in the gas phase, what we know now*. *Mass Spectrometry Reviews*, 2009. **28**(6): p. 898-917.
51. Kalli, A., et al., *Evaluation and optimization of mass spectrometric settings during data-dependent acquisition mode: focus on LTQ-Orbitrap mass analyzers*. *J Proteome Res*, 2013. **12**(7): p. 3071-86.
52. Makarov, A. and M. Scigelova, *Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry*. *J Chromatogr A*, 2010. **1217**(25): p. 3938-45.
53. Hu, Q., et al., *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. *J Mass Spectrom*, 2005. **40**(4): p. 430-43.
54. Yates, J.R., C.I. Ruse, and A. Nakorchevsky, *Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2009. **11**: p. 49-79.
55. Scigelova, M. and A. Makarov, *Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics*. *Proteomics*, 2006. **6 Suppl 2**: p. 16-21.
56. Douglas, D.J., A.J. Frank, and D. Mao, *Linear ion traps in mass spectrometry*. *Mass Spectrom Rev*, 2005. **24**(1): p. 1-29.
57. Seidler, J., et al., *De novo sequencing of peptides by MS/MS*. *Proteomics*, 2010. **10**(4): p. 634-49.
58. Dorfer, V., et al., *MS Amanda, a universal identification algorithm optimized for high accuracy tandem mass spectra*. *J Proteome Res*, 2014. **13**(8): p. 3679-84.
59. Jian, L., et al., *A novel algorithm for validating peptide identification from a shotgun proteomics search engine*. *J Proteome Res*, 2013. **12**(3): p. 1108-19.
60. Cottrell, J.S., *Protein identification using MS/MS data*. *Journal of Proteomics*, 2011. **74**(10): p. 1842-1851.
61. F, D.I.G., et al., *A simple and effective method to analyze membrane proteins by SDS-PAGE and MALDI mass spectrometry*. *Anticancer Res*, 2010. **30**(4): p. 1121-9.

7 Apenndiks

Resultater fra eksosom stanardløsning (første forsøk)

Grønn =best treff

Gul=middel treff

Rød = dårlig treff

X = ingen treff

Ikke påvist = proteinet ikke påvist i prøver

Gamma-glutamyltranspeptidase 1 ID P19440	N-95/N-120/N-230	N-266/N-297/N-344	N-511	Antall unike peptider	Score	Utbytte i %
Exo-uten PNGase F-1-ms1	x/x/x	x/x/x	X	2	116,48	22,32
Exo-Uten PNGase F-1-ms2	x/x/x	x/x/x	x	2	96,31	20,74
Exo-uten PNGase F-2-ms1	x/x/x	x/x/x	x	2	104,99	19,33
Exo-uten PNGase F2-ms2	x/x/x	x/x/x	X	3	100,17	20,40
Exo-med PNGase F-1-ms1	x/x/grønn	x/x/rød	X	5	132,02	33,22
Exo-med PNGase F-1-ms1	x/x/grønn	x/x/rød	Grønn	4	143,11	32,16
Exo-med PNGase F-2-ms1	Rød/x/grønn	x/x/x	Grønn	8	164,27	42,88
Exo-med PNGase F-2-ms2	x/grønn/grønn	x/x/x	Grønn	9	174,73	34,45

Dipeptidase 1 ID P16444	N-57/N-279/N-332	N-358	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1-ms1	x/x/x	Rød	9	280,97	53,77

Exo-uten PNGase F- 1-ms2	x/rød/x	Rød	7	251,09	63,50
Exo-uten PNGase F- 2-ms1	x/x/x	Rød	8	233,20	47,93
Exo-uten PNGase F- 2-ms2	x/rød/x	X	8	247,74	57,91
Exo-med PNGase F- 1-ms1	Grønn/rød/grønn	Grønn	14	339,07	60,34
Exo-med PNGase F- 1-ms2	Grønn/rød/grønn	Grønn	15	361,55	60,34
Exo-med PNGase F- 2-ms1	Grønn/x/grønn	Grønn	18	332,52	42,58
Exo-med PNGase F- 2-ms2	Grønn/x/grønn	Grønn	16	365,24	41,36

Semenogelin-2 ID Q02383	N-272	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1-ms1	Rød	23	637,72	66,32
Exo-uten PNGase F-1-ms2	Rød	21	640,27	64,95
Exo-uten PNGase F-2-ms1	Rød	34	853,86	80,76
Exo-uten PNGase F-2-ms2	Rød	38	905,96	85,22
Exo-med PNGase F-1- ms1	Grønn	37	803,39	81,27
Exo-med PNGase F-1- ms2	Rød	30	760,75	81,10
Exo-med PNGase F-2- ms1	Grønn	62	1731,77	85,57
Exo-med PNGase F-2- ms2	Grønn	61	1767,99	89,00

Aminopektidene N ID P15144	N-128/N- 234/N-265	N-319/N- 527/N-573	N-625/N- 681/N-735/N- 818	Antall unike pektider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1- ms1	x/x/x	x/x/x	x/x/x/x	15	423,78	45,50
Exo-uten PNGase F-1- ms2	x/x/x/	x/x/x/	x/x/x/x/	12	444,64	46,74
Exo-uten PNGase F-2- ms1	x/x/x	x/x/x	x/x/x/x	16	372,78	42,19
Exo-uten PNGase F-2- ms2	x/X/X	x/X/X	x/X/X	21	374,12	46,54
Exo-med PNGase F-1- ms1	Grønn/grønn/ grønn	Rød/rød/x	x/grønn/x/grønn	27	593,52	61,12
Exo-med PNGase F-1- ms2	Grønn/rød/ grønn	Rød/x/x	Rød/grønn/rød/ grønn	23	601,48	61,01
Exo-med PNGase F-2- ms1	Grønn/grønn/ grønn	x/x/x	X/grønn/X/X	28	371,44	39,61
Exo-med PNGase F-2- ms2	Grønn/grønn/ grønn	X/x/x	x/grønn/grønn/ grønn	28	323,03	36,09

Neprilysin ID P08473	N-145	N-285	N-325	N-628	Antall unike pektider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1- ms1	X	X	X	X	9	276,07	52,40
Exo-uten PNGase F-1- ms2	X	X	X	X	9	339,94	52,48
Exo-uten PNGase F-2- ms1	X	X	X	X	15	330,21	52,00
Exo-uten PNGase F-2-	X	X	X	X	15	389,70	50,80

ms2							
Exo-med PNGase F-1- ms1	Grønn	X	X	X	14	303,71	43,33
Exo-med PNGase F-1- ms2	Rød	X	X	X	11	277,07	46,27
Exo-med PNGase F-2- ms1	Rød	X	Rød	X	11	217,95	39,60
Exo-med PNGase F-2- ms2	Grønn	X	X	X	12	259,37	30,93

Dipeptidyl peptidase 4 ID P27487	N-85/N-N- 92/N-150	N-219/N- 229/N-281	N-321/N- 520/N- 685	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1- ms1	x/x/x	x/x/x	x/x/x	8	264,30	34,33
Exo-uten PNGase F-1- ms2	x/x/x/	x/x/x	x/x/x	8	275,85	39,16
Exo-uten PNGase F-2- ms1	x/x/x/	x/x/x	x/x/x	7	235,48	37,21
Exo-uten PNGase F-2- ms2	x/X/X	X/X/X	x/X/X	6	209,10	27,94
Exo-med PNGase F-1- ms1	x/x/grønn	x/x/x	x/x/x	11	230,72	31,98
Exo-med PNGase F-1- ms2	x/x/grønn	x/x/x	x/x/x	10	242,92	33,29
Exo-med PNGase F-2- ms1	x/x/x	x/x/x	x/x/x	6	71,52	18,02
Exo-med PNGase F-2- ms2	x/x/x	x/x/x	x/x/x	4	70,52	18,02

Galectin-3-binding protein ID Q08380	N-69/N-125/N-192	N-362/N-398/N-551	N-580	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1-ms1	x/x/x	x/x/x	X	7	163,07	43,59
Exo-uten PNGase F-1-ms2	x/x/x/	x/x/x/	X	6	170,02	39,66
Exo-uten PNGase F-2-ms1	x/x/x	x/x/x	X	11	174,75	43,76
Exo-uten PNGase F-2-ms2	x/X/X	x/X/X	X	9	183,44	43,76
Exo-med PNGase F-1-ms1	Grønn/x/x	x/grønn/rød	Grønn	12	192,07	43,42
Exo-med PNGase F-1-ms2	Grønn/x/x	x/grønn/x	Grønn	12	186,92	45,30
Exo-med PNGase F-2-ms1	Grønn/x/x	x/grønn/x	Grønn	7	137,01	25,63
Exo-med PNGase F-2-ms2	Grønn/x/x	x/grønn/x	Grønn	8	123,58	22,05

Thy-1 membrane glycoprotein ID P04216	N-42	N-79	N-119	N-139	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1-ms1	X	X	X	X	1	54,16	18,63
Exo-uten PNGase F-1-ms2	X	X	X	X	1	54,91	18,63
Exo-uten PNGase F-2-ms1	X	X	X	X	2	51,62	18,63
Exo-uten PNGase F-2-ms2	X	X	X	X	2	55,87	9,94
Exo-med	Grønn	Rød	X	X	4	76,87	37,89

PNGase F-1- ms1							
Exo-med PNGase F-1- ms2	Grønn	X	X	X	2	61,25	31,68
Exo-med PNGase F-2- ms1	Grønn	Rød	X	X	2	14,30	28,57
Exo-med PNGase F-2- ms2	Grønn	Rød	X	X	3	20,87	28,57

Podocalyxin ID O00592-2	N-33/N- 43/N-104/	N-144	N-360	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1- ms1	x/x/x/	X	X	3	91,31	17,30
Exo-uten PNGase F-1- ms2	x/x/x	X	X	2	109,61	19,02
Exo-uten PNGase F-2- ms1	x/x/x	X	X	2	93,73	15,97
Exo-uten PNGase F-2- ms2	x/x/x	X	X	3	101,13	17,30
Exo-med PNGase F-1- ms1	x/x/x	X	X	4	81,96	17,30
Exo-med PNGase F-1- ms2	x/x/x	X	X	3	85,00	15,97
Exo-med PNGase F-2- ms1	x/x/x	X	Grønn	8	135,43	21,67
Exo-med PNGase F-2- ms2	x/x/x	X	Grønn	8	140,09	21,67

Prostatic acid phosphatase ID P15309	N-94	N-220	N-333	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1-ms1	X	X	X	2	38,38	17,36
Exo-uten PNGase F-1-ms2	X	X	X	3	47,24	22,02
Exo-uten PNGase F-2-ms1	X	X	X	2	48,14	17,36
Exo-uten PNGase F-2-ms2	X	X	X	4	56,21	17,36
Exo-med PNGase F-1-ms1	X	x	X	3	32,32	17,36
Exo-med PNGase F-1-ms2	Grønn	X	X	3	53,29	20,98
Exo-med PNGase F-2-ms1	X	X	X	1	7,55	15,03
Exo-med PNGase F-2-ms2	Grønn	X	X	3	16,01	19,43

G-protein coupled receptor family C group 5 member B ID Q9NZH0	N-30	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1-ms1	X	2	25,63	14,89
Exo-uten PNGase F-1-ms2	X	1	30,95	12,90
Exo-uten PNGase F-2-ms1	X	3	39,58	12,90
Exo-uten PNGase F-2-ms2	X	3	39,94	14,89
Exo-med PNGase F-1-ms1	X	3	18,60	20,84
Exo-med PNGase F-1-ms2	X	3	16,91	12,90
Exo-med PNGase F-2-ms1	X	2	7,97	15,38

Exo-med PNGase F-2-ms2	X	2	8,01	5,96
-------------------------------	---	---	------	------

Pro-epidermal growth factor ID P01133-2	N-38/N-104/N-117	N-148/N-324/N-404	N-596/N-815/N-926	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1-ms1	x/x/x	x/x/x	rød/x/x	2	47,28	11,06
Exo-uten PNGase F-1-ms2	X/X/X	x/X/X	X/X/X	2	50,08	9,79
Exo-uten PNGase F-2-ms1	X/rød/x	x/x/x	x/x/x	4	50,79	13,82
Exo-uten PNGase F-2-ms2	x/X/X	x/X/X	x/X/X	4	47,28	10,47
Exo-med PNGase F-1-ms1	x/X/X	x/X/X	X/X/X	4	46,64	12,35
Exo-med PNGase F-1-ms2	X/rød/x	x/x/rød	Grønn/x/x	5	58,45	11,58
Exo-med PNGase F-2-ms1	x/x/x	x/x/x	Grønn/x/x	8	60,23	9,26
Exo-med PNGase F-2-ms2	x/x/x	x/x/x	Grønn/x/x	7	64,42	9,26

Aquaporin-2 ID P41181	N-123	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1-ms1	Ikke påvist	-	-	-
Exo-uten PNGase F-1-ms2	X	1	42,64	22.14
Exo-uten PNGase F-2-ms1	Ikke påvist	-	-	-

Exo-uten PNGase F-2-ms2	Ikke påvist	-		
Exo-med PNGase F-1-ms1	X	1	28,01	20,03
Exo-med PNGase F-1-ms2	Ikke påvist	-	-	-
Exo-med PNGase F-2-ms1	X	4	52,50	29,15
Exo-med PNGase F-2-ms2	X	5	61,33	29,15

Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5 ID P22732	N-51	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1-ms1	X	2	63,77	10,38
Exo-uten PNGase F-1-ms2	X	2	72,15	10,38
Exo-uten PNGase F-2-ms1	X	3	60,77	11,78
Exo-uten PNGase F-2-ms2	X	2	53,21	11,58
Exo-med PNGase F-1-ms1	X	4	53,15	8,89
Exo-med PNGase F-1-ms2	X	2	58,88	11,58
Exo-med PNGase F-2-ms1	Ikke påvist	-	-	-
Exo-med PNGase F-2-ms2	X	3	23,51	10,38

Solute carrier family 12 member 1 ID Q13621	N-445	N-456	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1-ms1	X	X	6	117,21	15,74
Exo-uten PNGase F-1-ms2	X	X	5	114,84	19,20
Exo-uten PNGase F-2-ms1	X	X	4	109,83	19,02
Exo-uten PNGase F-2-ms2	X	X	6	122,62	17,83
Exo-med PNGase F-1-ms1	X	X	7	87,72	15,10

Exo-med PNGase F-1-ms2	X	X	7	94,73	14,65
Exo-med PNGase F-2-ms1	x	X	3	21,81	10,19
Exo-med PNGase F-2-ms2	x	X	2	18,75	6,92

Xaa-Pro aminopeptidase 2 ID O43895	N-35	N-49	N-65	N-278	N-291	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1-ms1	X	X	X	X	X	2	79,93	26,71
Exo-uten PNGase F-1-ms2	X	X	X	X	X	2	75,45	29,38
Exo-uten PNGase F-2-ms1	X	X	X	X	X	4	82,94	36,94
Exo-uten PNGase F-2-ms2	X	X	X	X	X	2	72,56	33,9
Exo-med PNGase F-1-ms1	X	Rød	X	X	X	5	72,84	37,54
Exo-med PNGase F-1-ms2	Rød	Rød	X	X	X	2	73,57	29,97
Exo-med PNGase F-2-ms1	X	X	X	X	X	1	7,72	10,24
Exo-med PNGase F-2-ms2	X	X	X	X	X	1	9,55	11,73

Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A ID P62937	N-108	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1-ms1	X	2	40,25	23,03
Exo-uten PNGase F-1-ms2	X	2	45,89	37,58
Exo-uten PNGase F-2-ms1	X	2	51,67	33,33
Exo-uten PNGase F-2-ms2	X	2	53,47	41,21
Exo-med PNGase F-1-ms1	X	2	37,86	23,03
Exo-med PNGase F-1-ms2	X	2	28,94	23,03

Exo-med PNGase F-2-ms1	X	2	26,09	45,45
Exo-med PNGase F-2-ms2	X	3	25,96	33,94

Aquaporin-1 ID P29972	N-42	N-205	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1-ms1	X	Grønn	4	74,78	50,19
Exo-uten PNGase F-1-ms2	x	Grønn	5	77,64	50,19
Exo-uten PNGase F-2-ms1	x	Grønn	4	72,96	50,19
Exo-uten PNGase F-2-ms2	X	Grønn	5	81,64	50,19
Exo-med PNGase F-1-ms1	X	Grønn	4	72,92	50,19
Exo-med PNGase F-1-ms2	X	Grønn	3	47,91	50,19
Exo-med PNGase F-2-ms1	Grønn	Grønn	5	78,46	65,58
Exo-med PNGase F-2-ms2	Grønn	Grønn	5	71,08	65,58

Uromodulin ID P07911-4	N-38/N-76/N-80	N-232/N-275/N-322	N-396	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1-ms1	x/x/x	x/x/x	X	4	241,37	29,29
Exo-uten PNGase F-1-ms2	x/x/x	x/x/x	X	6	241,32	33,33
Exo-uten	x/x/x	x/x/x	x	7	237,68	33,33

PNGase F-2- ms1						
Exo-uten PNGase F-2- ms2	x/X/X	x/X/X	X	6	239,15	38,67
Exo-med PNGase F-1- ms1	x/x/x	x/x/x	X	9	283,78	37,06
Exo-med PNGase F-1- ms2	x/x/x	X/x/x	X	6	274,21	34,79
Exo-med PNGase F-2- ms1	x/x/x	x/x/x	X	11	313,43	29,29
Exo-med PNGase F-2- ms2	X/X/X	X/X/X	X	11	306,43	32,96

Ammonium transporter Rh type C ID Q9UBD6	N-48	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1-ms1	X	4	127,96	17,33
Exo-uten PNGase F-1-ms2	X	4	130,55	22,02
Exo-uten PNGase F-2-ms1	X	4	118,04	17,38
Exo-uten PNGase F-2-ms2	X	4	135,13	17,33
Exo-med PNGase F-1- ms1	X	4	106,94	17,33
Exo-med PNGase F-1- ms2	X	4	104,08	17,33
Exo-med PNGase F-2- ms1	X	2	39,74	5,43
Exo-med PNGase F-2- ms2	X	2	38,95	5,43

CD59 glycoprotein ID P13987	N-43	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1- ms1	X	3	89,73	28,13
Exo-uten PNGase F-1- ms2	X	3	91,01	28,13

Exo-uten PNGase F-2- ms1	X	5	108,68	28,13
Exo-uten PNGase F-2- ms2	X	4	96,70	28,13
Exo-med PNGase F-1- ms1	X	4	54,82	27,37
Exo-med PNGase F-1- ms2	X	3	52,14	27,34
Exo-med PNGase F-2- ms1	X	6	79,69	28,13
Exo-med PNGase F-2- ms2	X	7	95,88	28,13

Kininogen-1 ID P01042-2	48/169	N-205	N-249	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1- ms1	Grønn/X	X	X	2	38,71	27,63
Exo-uten PNGase F-1- ms2	x/X	X	X	1	36,75	21,08
Exo-uten PNGase F-2- ms1	Grønn/x	x	X	5	37,85	22,95
Exo-uten PNGase F-2- ms2	Grønn/x	Rød	X	4	41,40	32,79
Exo-med PNGase F-1- ms1	Grønn/x	Rød	Rød	3	23,54	17,56
Exo-med PNGase F-1- ms2	X/X	X	X	1	27,04	20,61
Exo-med PNGase F-2- ms1	x/x	X	X	4	33,45	19,18
Exo-med PNGase F-2- ms2	X/x	X	X	4	40,11	19,18

CD9 antigen ID P21926	N-52	N-53	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1-ms1	X	X	1	30,04	20,61
Exo-uten PNGase F-1-ms2	X	X	1	27,75	20,61
Exo-uten PNGase F-2-ms1	X	X	2	36,84	20,61
Exo-uten PNGase F-2-ms2	x	X	2	36,37	24,44
Exo-med PNGase F-1-ms1	X	X	2	20,89	20,61
Exo-med PNGase F-1-ms2	X	X	2	19,13	20,61
Exo-med PNGase F-2-ms1	X	X	2	11,46	20,61
Exo-med PNGase F-2-ms2	x	X	1	12,00	20,61

Vasorin ID Q6EMK4	N-101	N-117	N-273	N-500	N-528	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1-ms1	X	X	X	X	X	1	36,48	12,93
Exo-uten PNGase F-1-ms2	X	X	X	X	X	1	24,40	12,73
Exo-uten PNGase F-2-ms1	X	X	X	X	X	3	35,92	20,95
Exo-uten PNGase F-2-ms2	X	X	Rød	X	X	2	35,92	18,28
Exo-med PNGase F-1-ms1	X	X	X	X	X	1	34,70	8,02
Exo-med PNGase F-1-ms2	X	X	X	X	X	1	14,55	10,55
Exo-med PNGase F-2-ms1	X	X	Rød	X	X	3	37,04	19,32

Exo-med PNGase F-2- ms2	X	X	Rød	Rød	Rød	3	32,16	19,61
--	---	---	-----	-----	-----	---	-------	-------

Transmembrane protease serine 2 ID O15393	N-213	N-249	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1-ms1	X	X	2	30,53	16,67
Exo-uten PNGase F-1-ms2	X	X	2	31,04	12,60
Exo-uten PNGase F-2-ms1	X	X	2	22,17	12,60
Exo-uten PNGase F-2-ms2	X	X	2	34,33	12,60
Exo-med PNGase F-1- ms1	X	X	2	26,63	13,01
Exo-med PNGase F-1- ms2	X	X	2	28,64	12,60
Exo-med PNGase F-2- ms1	X	X	1	8,10	4,27
Exo-med PNGase F-2- ms2	X	X	1	8,06	4,27

Uroplakin-2 ID O00526	N-28	N-57	N-66	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1- ms1	X	X	X	2	24,41	20,65
Exo-uten PNGase F-1- ms2	X	X	X	2	22,39	20,65
Exo-uten PNGase F-2- ms1	X	X	X	2	14,40	20,65
Exo-uten PNGase F-2- ms2	X	X	X	2	18,99	20,65

Exo-med PNGase F-1- ms1	X	X	X	3	14,79	20,65
Exo-med PNGase F-1- ms2	X	X	X	1	17,88	20,65
Exo-med PNGase F-2- ms1	X	X	X	1	5,80	20,65
Exo-med PNGase F-2- ms2	X	X	X	1	6,59	8,70

Olfactomedin-4 ID Q6UX06	N-72	N-136	N-253	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F-1-ms1	X	X	X	1	22,80	11,76
Exo-uten PNGase F-1-ms2	X	X	X	1	22,52	10,58
Exo-uten PNGase F-2-ms1	X	X	X	1	20,39	10,59
Exo-uten PNGase F-2-ms2	X	X	X	2	24,47	13,33
Exo-med PNGase F-1- ms1	Rød	X	X	3	28,35	20,39
Exo-med PNGase F-1- ms2	Rød	X	X	2	25,32	18,04
Exo-med PNGase F-2- ms1	X	X	X	1	9,33	10,78
Exo-med PNGase F-2- ms2	X	X	X	1	10,89	4,3

Resultater fra eksosom standardløsning (andre forsøk):

prominin-1 og 2/CD133 ID Q8N271	N-270	Score	Antall påviste unike peptider	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	41,89	5	15,29
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	41,13	3	16,19
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	42,88	3	16,67
Exo-med PNGase F 1ms1	Grønn	80,33	10	30,70
Exo-med PNGase F 2ms1	Grønn	48,72	6	27,58
Exo-med PNGase F 3ms1	Grønn	78,70	4	28,79
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	46,99	6	15,23
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	46,78	5	15,95
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	46,40	4	16,31
Exo-med PNGase F 1ms2	Rød	68,96	5	28,06
Exo-med PNGase F 2ms2	Grønn	71,83	7	27,58
Exo-med PNGase F 3ms2	Grønn	48,29	7	30,45
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	50,66	7	17,87
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	47,96	7	18,11
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	35,52	5	13,07
Exo-med PNGase F 1ms3	Grønn	69,38	9	28,78
Exo-med PNGase F 2ms3	Grønn	81,75	7	25,30
Exo-med PNGase F 3ms3	Grønn	89,46	9	26,14

Thy-1/CD90 membrane glycoprotein ID P04216	N-42	N-79	N-119	N-139	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	X	X	X	3	61,97	18,63
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	X	X	X	2	50,26	18,63
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	X	X	X	3	58,10	18,63
Exo-med PNGase F 1ms1	Grønn	Rød	Gul	X	6	95,82	62,11
Exo-med PNGase F 2ms1	Grønn	Rød	Grønn	X	6	71,10	62,11
Exo-med PNGase F 3ms1	Grønn	Rød	Rød	X	5	90,61	62,11
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	X	X	X	3	52,45	18,63
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	X	X	X	3	50,93	18,63
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	X	X	X	3	54,35	18,63
Exo-med PNGase F 1ms2	Grønn	Rød	X	X	5	73,04	39,13

Exo-med PNGase F 2ms2	Grønn	Rød	Rød	X	5	89,81	62,11
Exo-med PNGase F 3ms2	grønn	grønn	rød	X	5	69,97	57,14
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	X	X	X	2	51,21	18,63
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	X	X	X	3	46,28	18,63
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	X	X	X	2	44,78	18,63
Exo-med PNGase F 1ms3	Grønn	Rød	Rød	X	5	80,37	62,11
Exo-med PNGase F 2ms3	Grønn	Rød	Grønn	X	6	97,12	62,11
Exo-med PNGase F 3ms3	Grønn	Rød	Gul	X	6	88,70	62,11

Olfactomedin-4 ID Q6UX06	N-72	N-136	N-253	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	X	X	4	41,61	21,96
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	X	X	3	29,92	20,20
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	X	X	4	42,66	34,90
Exo-med PNGase F 1ms1	Grønn	X	X	7	59,88	31,18
Exo-med PNGase F 2ms1	Rød	X	X	5	45,92	30,78
Exo-med PNGase F 3ms1	Rød	X	X	4	72,67	31,76
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	X	X	3	44,54	19,22
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	X	X	3	47,00	15,49
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	X	X	2	42,96	23,73
Exo-med PNGase F 1ms2	Grønn	X	X	6	58,16	26,86
Exo-med PNGase F 2ms2	Rød	X	X	5	53,30	33,58
Exo-med PNGase F 3ms2	Rød	X	X	6	50,22	31,37
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	X	X	4	44,19	27,54
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	X	X	4	36,67	11,57
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	X	X	3	31,48	19,02
Exo-med PNGase F 1ms3	Grønn	X	X	5	48,73	24,71
Exo-med PNGase F 2ms3	Rød	X	X	5	42,11	25,29
Exo-med PNGase F 3ms3	Rød	X	X	5	42,76	27,25

3ms3						
-------------	--	--	--	--	--	--

Prostatahyperplasi syre fosfatase ID P15309	N-94	N-220	N-333	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	X	X	4	66,79	19,69
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	X	X	3	38,91	15,54
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	X	X	5	56,80	33,16
Exo-med PNGase F 1ms1	Grønn	X	X	7	79,21	31,09
Exo-med PNGase F 2ms1	Grønn	Grønn	X	7	79,17	26,17
Exo-med PNGase F 3ms1	Grønn	Grønn	X	5	86,02	28,50
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	X	X	4	57,06	17,36
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	x	x	5	68,55	27,46
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	Rød	X	3	60,78	28,76
Exo-med PNGase F 1ms2	Grønn	Grønn	X	6	71,92	28,76
Exo-med PNGase F 2ms2	Grønn	Grønn	X	8	93,01	34,97
Exo-med PNGase F 3ms2	grønn	Grønn	X	8	89,97	29,02
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	x	X	5	54,72	26,68
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	X	X	5	66,74	27,47
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	x	X	4	48,85	28,50
Exo-med PNGase F 1ms3	Grønn	Grønn	X	7	77,97	29,02
Exo-med PNGase F 2ms3	Grønn	Grønn	X	7	84,19	30,38
Exo-med PNGase F 3ms3	Grønn	Grønn	X	7	92,29	40,16

Galectin-3-binding protein ID Q08380	N-69	N-125	N-192, N-362, N-398	N-551,N- 580	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1- ms1	x	x	xx	X,x	11	172,14	49,57
Exo-uten PNGase F 2- ms1	x	x	xx	xx	7	144,01	47,35
Exo-uten PNGase F 3- ms1	X	X	xx	xx	8	176,19	36,41
Exo-med PNGase F 1ms1	Grønn	Grønn	x.x, grønn	Rød, grønn	17	244,09	60,85
Exo-med PNGase F 2ms1	Grønn	Grønn	X,x, grønn	Rød, grønn	15	222,86	55,04
Exo-med PNGase F 3ms1	Grønn	Rød	X,x, grønn	Rød, rød	10	238,52	61,54
Exo-uten PNGase F 1- ms2	X	Rød	x.x.x	x.x	10	185,31	55,04

Exo-uten PNGase F 2- ms2	x	x	X,x, x	X,x	11	197,35	48,55
Exo-uten PNGase F 3- ms2	x	x	X,x, x	X,x	9	187,71	38,12
Exo-med PNGase F 1ms2	Grønn	Rød	X, x grønn	Rød, grønn	12	231,39	55,04
Exo-med PNGase F 2ms2	Grønn	Grønn	x.x.grønn	Rød, grønn	15	273,42	49,40
Exo-med PNGase F 3ms2	Grønn	grønn	x.x.grønn	Gul, grønn	17	233,64	53,33
Exo-uten PNGase F 1- ms3	x	x	x.x.x	x.x	9	170,26	41,88
Exo-uten PNGase F 2- ms3	x	x	x.x.x	x.x	16	158,68	47,52
Exo-uten PNGase F 3-ms3	x	x	x.x.x	x.x	9	160,22	36,92
Exo-med PNGase F 1ms3	Grønn	Rød	x.x,grønn	Rød.grønn	15	226,38	53,33
Exo-med PNGase F 2ms3	Grønn	Rød	x.x.grønn	Rød.grønn	14	240,40	49,40
Exo-med PNGase F 3ms3	Grønn	Rød	x.x, grønn	Rød, grønn	15	229,81	53,33

Glutamyl aminopeptidase ID Q07075	N-124,N- 197, N-324	N-340, N-554, N-589, N-597	N-607,N- 610, N-678	N-763,N- 773, N-801,N- 828	Antall påviste unike peptide r	Score	Cover age i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X,X,X	X.X.X.X	X-X-X	X.X.X.X	7	54,78	16,61
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X.X.X	X.X.X.X	X-X-X	X.X.X.X	3	28,16	9,20
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X.X.X	X.X.X.X	X.X.X	X.X.X.X	3	49,31	15,26
Exo-med PNGase F 1ms1	X,x.gul	X,x,x.x	Grønn, grønn, x	Grønn, g,x,rød	10	76,70	27,38
Exo-med PNGase F 2ms1	Rød,x,rød	X,x,x,x	Grønn.grøn n, x	Grønn, grønn, x, x	4	59,94	24,97
Exo-med PNGase F 3ms1	X,x,rød	X,x,x,x	Grønn, grønn, x	Grønn, grønn, rød, x	3	62,59	20,79
Exo-uten PNGase F 1-ms2	x.x.x	x.x.x.x	x.x.x	x.x.x.x	3	35,83	12,33
Exo-uten PNGase F 2-ms2	x.x.x	x.x.x.x	x.x.x	x.x.x.x	3	54,49	16,72
Exo-uten PNGase F 3-ms2	x.x.x.	x.x.x.x	x.x.x	x.x.x.x	3	58,84	17,97

Exo-med PNGase F 1ms2	x.x.rød	x.x.x.x	Rød, rød, rød	Grønn, grønn, rød, x	4	67,64	26,96
Exo-med PNGase F 2ms2	x.x.rød	x.x.x.x	Grønn, grønn, x	Grønn, grønn, x, x	7	79,12	24,45
Exo-med PNGase F 3ms2	X,x, gul	x.x.x.x	Grønn, grønn, x	Grønn, grønn, x, x	9	59,70	24,19
Exo-uten PNGase F 1-ms3	x.x.x	x.x.x.x	x.x.x	x.x.x.x	3	49,29	17,97
Exo-uten PNGase F 2-ms3	x.x.x	x.x.x.x	x.x.x	x.x.x.x	5	24,13	12,33
Exo-uten PNGase F 3-ms3	x.x.x	x.x.x.x	x.x.x	x.x.x.x	4	31,42	16,93
Exo-med PNGase F 1ms3	x.x.rød	x.x.x.x	Grønn, grønn, x	Grønn, grønn, x,rød	7	68,82	21,94
Exo-med PNGase F 2ms3	x.x.rød	x.x.x.x	Grønn, grønn, x	Grønn, grønn,x,rød	7	73,19	20,90
Exo-med PNGase F 3ms3	X,x, rød	x.x.x.x	Grønn.grøn n.x	Grønn.x.x .rød	6	58,12	17,24

Dipeptidase 1 ID P16444	N-57	N-279	N-332	N-358	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	X	X	Grønn	17	450,89	64,96
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	Rød	X	Grønn	12	363,56	72,99
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	X	X	Grønn	14	428,27	63,26
Exo-med PNGase F 1ms1	Grønn	Grønn	Rød	Grønn	22	593,48	82,73
Exo-med PNGase F 2ms1	Grønn	Grønn	Rød	Grønn	19	555,68	80,29
Exo-med PNGase F 3ms1	Grønn	Grønn	Rød	Grønn	16	580,99	80,29
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	X	X	Rød	14	400,81	61,31
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	X	x	Grønn	18	467,97	63,23
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	X	X	Grønn	12	483,3	69,83

Exo-med PNGase F 1ms2	Grønn	Grønn	Rød	Grønn	18	587,42	79,81
Exo-med PNGase F 2ms2	Grønn	Grønn	Rød	Grønn	21	583,55	82,00
Exo-med PNGase F 3ms2	grønn	grønn	rød	Grønn	22	524,68	80,29
Exo-uten PNGase F 1-ms3	x	x	x	Grønn	15	435,37	63,26
Exo-uten PNGase F 2-ms3	x	x	x	Grønn	16	410,48	68,13
Exo-uten PNGase F 3-ms3	x	x	x	Grønn	16	417,20	63,26
Exo-med PNGase F 1ms3	Grønn	Grønn	Rød	Grønn	20	551,51	81,51
Exo-med PNGase F 2ms3	Grønn	Grønn	Grønn	Grønn	21	570,49	80,29
Exo-med PNGase F 3ms3	Grønn	Grønn	Rød	Grønn	19	527,22	77,86

Aminopeptidase N ID P15144	N-128,N-234,N-265	N-319, N-527, N-573	N-625, N-681,	N-735, N-818	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	x.x.x.x	x.x.x.x	x.x	xx	38	785,18	54,91
Exo-uten PNGase F 2-ms1	Xxx	xxx	xx	xx	18	593,06	55,33
Exo-uten PNGase F 3-ms1	Xxx	xxx	xx	xx	31	821,05	55,95
Exo-med PNGase F 1ms1	Grønn, grønn, grønn	Grønn, grønn, grønn	Grønn, grønn	Rød, grønn	54	1400,10	86,04
Exo-med PNGase F 2ms1	Grønn, grønn, grønn	Grønn, grønn, grønn	Grønn, grønn	Rød, grønn	45	1263,12	83,45
Exo-med PNGase F 3ms1	Grønn, grønn, grønn	Grønn, grønn, grønn	Grønn, grønn	X, grønn	38	1478,27	85,32
Exo-uten PNGase F 1-ms2	x.x, x	x.x.x	x.x	x.x	32	728,03	57,50
Exo-uten PNGase F 2-ms2	x.x.x	x.x.x	x.x	x.x	38	782,13	55,95
Exo-uten PNGase F 3-ms2	x.x.x	x.x.x	x.x	x.x	28	799,61	60,08
Exo-med PNGase F 1ms2	Grønn, grønn,	Grønn, grønn,	Grønn, grønn	Rød, grønn	41	1268,04	81,39

	grønn	gul					
Exo-med PNGase F 2ms2	Grønn, grønn, grønn	Grønn, grønn, grønn	Grønn, grønn	Rød, grønn	43	1321,51	79,73
Exo-med PNGase F 3ms2	Grønn, grønn, grønn	Grønn, grønn, grønn	Grønn, grønn	Rød, grønn	56	1403,62	80,77
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X,x.x	x.x.x	x.x	x.x	40	764,51	53,88
Exo-uten PNGase F 2-ms3	x.x.x	x.x.x	x.x	x.x	37	691,29	54,81
Exo-uten PNGase F 3-ms3	x.x.x	x.x.x	x.x	x.x	37	680,99	56,51
Exo-med PNGase F 1ms3	Grønn, grønn, grønn	Grønn, grønn, grønn	Grønn, grønn	Rød, grønn	48	1342,20	80,77
Exo-med PNGase F 2ms3	Grønn, grønn, grønn	Grønn, Grønn, grønn	Grønn, grønn	Rød, grønn	54	1357,18	81,08
Exo-med PNGase F 3ms3	Grønn,grøn n, Grønn	Grønn, grønn, grønn	Grønn, grønn	Rød, grønn	51	1377,69	85,01

Nepriylsin ID P08473	N-145	N-285	N-325	N-628	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	X	X	X	31	780,28	65,47
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	X	X	X	18	531,83	64,93
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	X	X	X	23	739,98	65,47
Exo-med PNGase F 1ms1	Grønn	X	X	X	30	750,68	66,80
Exo-med PNGase F 2ms1	Grønn	X	X	X	22	708,01	66,40
Exo-med PNGase F 3ms1	Grønn	Rød	X	X	17	770,87	69,07
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	x	X	X	21	675,77	66,40
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	x	X	X	27	723,22	66,40

Exo-uten PNGase F 3- ms2	X	x	X	X	20	792,10	65,33
Exo-med PNGase F 1ms2	Grønn	Grønn	X	X	23	700,65	66,93
Exo-med PNGase F 2ms2	Grønn	Grønn	X	X	27	723,27	66,80
Exo-med PNGase F 3ms2	grønn	grønn	X	X	29	720,02	69,47
Exo-uten PNGase F 1- ms3	x	x	X	X	27	754,05	65,33
Exo-uten PNGase F 2- ms3	x	x	X	X	36	694,02	65,47
Exo-uten PNGase F 3- ms3	x	x	X	X	26	673,57	64,93
Exo-med PNGase F 1ms3	Grønn	x	X	X	27	716,27	66,80
Exo-med PNGase F 2ms3	Grønn	x	X	X	24	765,88	64,53
Exo-med PNGase F 3ms3	Grønn	X	X	X	23	685,86	65,33

Plasma serine protease inhibitor ID P05154	N-249	N-262	N-338	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	X	X	1	7,56	5,91
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	X	X	1	15,66	23,15
Exo-uten PNGase F 3-ms1	x	x	x	1	17,44	16,75
Exo-med PNGase F 1ms1	X	X	X	3	19,63	33,00
Exo-med PNGase F 2ms1	X	X	X	2	14,57	17,98
Exo-med PNGase F 3ms1	X	Rød	X	2	27,65	28,33
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	X	X	2	26,41	19,46
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	X	X	4	18,13	27,09
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	X	X	2	22,66	19,46
Exo-med PNGase F 1ms2	X	Rød	x	1	20,71	33,00
Exo-med PNGase F 2ms2	x	x	x	1	15,78	17,24
Exo-med PNGase F 3ms2	X	grønn	X	4	18,42	22,66
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	x	X	2	23,77	25,12
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	x	X	4	27,66	27,83
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	x	X	3	13,20	11,58
Exo-med PNGase F 1ms3	X	grønn	X	2	13,70	32,27
Exo-med PNGase F 2ms3	X	Rød	X	4	24,29	17,73
Exo-med PNGase F 3ms3	X	Rød	X	3	19,51	23,15

Vasorin ID Q6EMK4	N-101, N-117	N-273	N-500	N-528	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X,x	Grønn	X	Rød	4	56,87	26,00
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X,x	x	X	x	1	21,24	14,26
Exo-uten PNGase F 3-ms1	xx	Grønn	X	Rød	4	86,32	26,00
Exo-med PNGase F 1ms1	X, rød	Grønn	X	Rød	5	71,40	32,84
Exo-med PNGase F 2ms1	X,rød	Grønn	X	Rød	3	58,66	30,61
Exo-med PNGase F 3ms1	X,rød	Grønn	X	x	3	86,73	26,60
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X,x	Rød	X	X	3	38,50	23,03
Exo-uten PNGase F 2-ms2	xx	Rød	X	X	4	52,60	23,63
Exo-uten PNGase F 3-ms2	x.x	grønn	x	X	4	79,76	23,03
Exo-med PNGase F 1ms2	X,rød	Rød	X	X	2	52,61	24,37
Exo-med PNGase F 2ms2	X,rød	Grønn	x	X	4	78,10	30,61
Exo-med PNGase F 3ms2	X,grønn	Grønn	X	Rød	7	85,95	32,84
Exo-uten PNGase F 1-ms3	x.x	grønn	x	X	4	62,89	23,03
Exo-uten PNGase F 2-ms3	x.x	grønn	x	X	8	48,76	26,00
Exo-uten PNGase F 3- ms3	X,x	Rød	x	X	3	42,45	22,14
Exo-med PNGase F 1ms3	X,rød	Grønn	X	X	4	72,21	24,52
Exo-med PNGase F 2ms3	X,Rød	Grønn	X	X	5	105,82	27,49
Exo-med PNGase F 3ms3	X,grønn	Grønn	X	X	7	97,79	27,49

Xaa-Pro aminopeptidase 2 ID O43895	N-35,N-49	N-65	N-278	N-291	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1- ms1	x.x	X	X	X	11	178,95	42,73
Exo-uten PNGase F 2- ms1	X. x	X	X	X	4	122,31	35,76
Exo-uten PNGase F 3- ms1	X x	X	X	X	8	177,57	42,58
Exo-med PNGase F 1ms1	Grønn, grønn	X	X	X	10	174,92	38,72
Exo-med PNGase F	Rød, rød	X	X	X	7	124,53	42,28

2ms1							
Exo-med PNGase F 3ms1	Grønn, grønn	X	X	X	6	160,29	40,50
Exo-uten PNGase F 1-ms2	x.x	X	Rød	Rød	7	128,59	52,97
Exo-uten PNGase F 2-ms2	x.x	X	X	X	10	163,66	48,07
Exo-uten PNGase F 3-ms2	x.x	X	X	X	9	185,47	43,62
Exo-med PNGase F 1ms2	Grønn, grønn	X	X	X	7	152,49	39,76
Exo-med PNGase F 2ms2	Rød, rød	X	X	X	7	146,39	37,83
Exo-med PNGase F 3ms2	Gønn, grønn	X	X	X	11	130,65	39,47
Exo-uten PNGase F 1-ms3	x.x	X	X	X	12	161,45	48,07
Exo-uten PNGase F 2-ms3	x.x	X	X	X	12	119,59	45,10
Exo-uten PNGase F 3-ms3	x.x	X	X	X	11	103,65	41,69
Exo-med PNGase F 1ms3	Grønn, grønn	X	X	X	10	155,61	41,25
Exo-med PNGase F 2ms3	Grønn, grønn	X	X	X	9	148,63	40,36
Exo-med PNGase F 3ms3	Grønn, grønn	X	X	X	11	134,43	42,14

Gamma-glutamyltranspeptidase 1 ID P19440	N-95, N-120, N-230	N-266, N-297	N-344	N-511	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	xx.x.x	x.x.	x	x	9	157,44	38,66
Exo-uten PNGase F 2-ms1	x.x.x	Rød.x	x	x	4	124,96	32,16
Exo-uten PNGase F 3-ms1	xxx	xx	x	x	4	185,20	37,43
Exo-med PNGase F 1ms1	X,x, grønn	Grønn, rød	Grønn	Grønn	14	325,9	59,58
Exo-med PNGase F 2ms1	X,grønn, grønn	X, grønn	Grønn	Grønn	13	283,89	53,08
Exo-med PNGase F 3ms1	X,grønn, grønn	Grønn, rød	Grønn	Grønn	9	322,72	62,57
Exo-uten PNGase F	x.x.x	x.x	x	x	6	145,6	39,72

1-ms2						6	
Exo-uten PNGase F 2-ms2	x.x.x	x.x	x	x	8	159,1 6	33,22
Exo-uten PNGase F 3-ms2	x.x.x.	x.x	X	X	4	189,1 8	37,08
Exo-med PNGase F 1ms2	x.grønn, grønn	X, grønn	Grønn	Grøn n	12	320,8 9	53,08
Exo-med PNGase F 2ms2	x.grønn, grønn	X,x	Grønn	Grøn n	11	325,8 7	52,02
Exo-med PNGase F 3ms2	X,grønn, grønn	X, grønn	Grønn	Grøn n	17	303,6 2	55,71
Exo-uten PNGase F 1-ms3	x.x.x	x.x	x	X	8	184,3 2	38,31
Exo-uten PNGase F 2-ms3	x.x.x	x.x	x	X	12	147,5 5	27,77
Exo-uten PNGase F 3-ms3	x.x.x	x.x	Rød	X	7	157,9 7	33,22
Exo-med PNGase F 1ms3	X,grønn, grønn	Rød, grønn	Grønn	Grøn n	14	327,2 5	59,58
Exo-med PNGase F 2ms3	x.grønn, grønn	x.x	Grønn	Grøn n	12	295,9 7	50,97
Exo-med PNGase F 3ms3	X,grønn, grønn	Grønn, grønn	grønn	Grøn n	15	327,6 9	57,47

Dipeptidyl peptidase 4 ID P27487	N-85, N-92, N-150	N-219, N-229	N-281, N-321	N-520, N-685	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	x.x.x	x.x	x.x	X x	20	418,20	58,22
Exo-uten PNGase F 2-ms1	xxx	xx	xx	Xx	11	330,53	54,05
Exo-uten PNGase F 3-ms1	xxx	xx	xx	Grønn, rød	15	420,89	57,18
Exo-med PNGase F 1ms1	x, x, grønn	X,x	X,x	Grønn, x	23	470,75	63,05
Exo-med PNGase F 2ms1	X,x, grønn	X,x	X,x	Grønn, x	17	409,63	56,92
Exo-med PNGase F 3ms1	X,x, grønn	X,x	X,x	Grønn, x	18	631,49	63,32
Exo-uten PNGase F 1-ms2	x.x.x	x.x	x.x	x.x	16	415,89	53,26
Exo-uten PNGase F 2-ms2	x.x.x	x.x	x.x	Grønn, x	22	449,13	56,53
Exo-uten PNGase F 3-ms2	x.x.x	x.x	x.x	Rød	16	496,17	55,61

Exo-med PNGase F 1ms2	X,x, grønn	x.x	x.x	Grønn, x	14	463,49	60,05
Exo-med PNGase F 2ms2	x.x, grønn	x.x	x.x	Grønn.x	23	476,57	58,36
Exo-med PNGase F 3ms2	X,x, grønn	x.x	x.x	Grønn.x	30	517,32	64,62
Exo-uten PNGase F 1-ms3	x.x.x	x.x	x.x	x.x	22	485,22	54,18
Exo-uten PNGase F 2-ms3	x.x.x	x.x	x.x	Grønn.x	32	371,84	53,92
Exo-uten PNGase F 3-ms3	x.x.x	x.x	x.x	Grønn.x	7	356,08	51,44
Exo-med PNGase F 1ms3	X,x, grønn	X,x	x.x	Grønn, x	24	455,17	59,53
Exo-med PNGase F 2ms3	X,x, grønn	X,x	x.x	Grønn.x	23	464,76	57,96
Exo-med PNGase F 3ms3	X,X,grønn	x.x	x.rød	Grønn.x	22	602,02	67,10

Prolactin-inducible protein ID P12273	N-105	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	3	28,85	41,78
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	1	23,60	41,78
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	2	32,39	50,00
Exo-med PNGase F 1ms1	Rød	2	28,56	36,30
Exo-med PNGase F 2ms1	Rød	2	27,23	40,41
Exo-med PNGase F 3ms1	Rød	2	30,77	56,85
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	1	16,19	29,45
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	3	27,24	50,00
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	2	29,10	50,00
Exo-med PNGase F 1ms2	Rød	2	33,79	36,30
Exo-med PNGase F 2ms2	Rød	3	32,44	56,85
Exo-med PNGase F 3ms2	Rød	3	37,48	56,85
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	1	25,43	41,78
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	4	27,40	41,78
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	2	20,08	41,78
Exo-med PNGase F 1ms3	Rød	2	23,46	36,30
Exo-med PNGase F 2ms3	Rød	2	25,22	56,85
Exo-med PNGase F 3ms3	Rød	4	25,07	56,85

Kininogen-1 ID P01042-2	N-48	N-169	N-205	N-294	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	Grønn	X	X	X	6	62,57	44,50
Exo-uten PNGase F 2-ms1	Grønn	X	X	X	4	62,76	40,28
Exo-uten PNGase F 3-ms1	Grønn	X	X	X	6	86,66	51,76
Exo-med PNGase F 1ms1	Grønn	X	X	Rød	7	63,86	46,37
Exo-med PNGase F 2ms1	Grønn	X	Rød	Rød	7	82,90	54,80
Exo-med PNGase F 3ms1	Grønn	X	X	Rød	4	99,55	56,91
Exo-uten PNGase F 1-ms2	Grønn	X	X	Rød	7	81,80	57,14
Exo-uten PNGase F 2-ms2	Grønn	X	X	X	8	83,91	42,39
Exo-uten PNGase F 3-ms2	Grønn	X	X	Rød	7	90,13	53,86
Exo-med PNGase F 1ms2	Grønn	X	Rød	Rød	5	73,20	55,04
Exo-med PNGase F 2ms2	Grønn	X	X	X	5	78,69	40,75
Exo-med PNGase F 3ms2	Grønn	X	Rød	Grønn	11	98,79	55,97
Exo-uten PNGase F 1-ms3	Grønn	X	X	Rød	8	88,41	50,59
Exo-uten PNGase F 2-ms3	Grønn	X	X	x	8	70,73	46,37
Exo-uten PNGase F 3-ms3	Grønn	X	Rød	X	8	117,65	46,84
Exo-med PNGase F 1ms3	Grønn	X	X	X	8	75,10	47,07
Exo-med PNGase F 2ms3	Grønn	X	X	Rød	7	84,33	49,65
Exo-med PNGase F 3ms3	Grønn	X	X	Grønn	7	74,12	49,65

Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 ID P11279	N-37 N-45, N-62	N-76, N-84	N-103, N-107, N-121	N-130, N-165, N-181	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X,x, x,	X,x,	X,x, x	x, x, x	2	22	9,59
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X,x, x	X,x,	x.x.x	x.x.x	2	21,69	5,04
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X,x, x	X,x,	X,x, x	X,x, x	1	28,63	11,75
Exo-med PNGase F 1ms1	X,x, x	X,x,	Rød, x, grønn	Grønn, x, x	4	46	17,75
Exo-med PNGase F 2ms1	x.x.x	x.rød	Grønn. grønn.x. x	x.x.x	3	44,10	24,46
Exo-med PNGase F 3ms1	X,x,x	X,x,	Rød, x, grønn	Grønn, x, x	3	38,46	19,90
Exo-uten PNGase F 1-ms2	x.x.x	x.x	x.x.x	x.x.x	2	25,46	11,75
Exo-uten PNGase F 2-ms2	x.x.x	x.x	x.x.x	x.x.x	1	20,50	19,18
Exo-uten PNGase F 3-ms2	x.x.x	x.x.	x.x.x	x.x.x	1	33,67	11,75

Exo-med PNGase F 1ms2	X,x, x	X,x,	Rød, x, grønn	Grønn, x, x	3	37,95	23,98
Exo-med PNGase F 2ms2	x.x.x	x.x.	Rød, x, grønn	Grønn, x, x	3	43,00	19,90
Exo-med PNGase F 3ms2	Rød, rød, x	X, grønn	Gul, x, grønn	Grønn, x, x	6	37,32	37,89
Exo-uten PNGase F 1-ms3	x.x.x	x.x.	x.x.x	x.x.x	2	23,02	11,75
Exo-uten PNGase F 2-ms3	x.x.x	Rød, rød	x.x.x	x.x.x	1	21,70	20,62
Exo-uten PNGase F 3-ms3	x.x.x	x.x	x.x.x	x.x.x	1	17,15	16,07
Exo-med PNGase F 1ms3	x.x.x	x.x	Rød, x, grønn	Grønn, x, x	3	49,38	19,90
Exo-med PNGase F 2ms3	x.x.rød	Rød.rød	Rød, x, grønn	Grønn, x, x	4	55,73	28,30
Exo-med PNGase F 3ms3	x.x.x	x.x	Rød,x,grønn	Grønn,x	3	47,72	19,90

Polymeric immunoglobulin receptor ID P01833	N-83, N-90	N-135, N-186	N-421, N-469	N-499	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	Ikke påvist						
Exo-uten PNGase F 2-ms1	x.x	x.x	X,rød	X	1	9,86	9,29
Exo-uten PNGase F 3-ms1	Ikke påvist						
Exo-med PNGase F 1ms1	x.x	Grønn	x.x	x	1	4,37	6,94
Exo-med PNGase F 2ms1	x.x	x.x	Grønn.x	X	3	12,79	8,51
Exo-med PNGase F 3ms1	X,x	x.x	x.grønn	X	1	6,16	11,65
Exo-uten PNGase F 1-ms2	Ikke påvist						
Exo-uten PNGase F 2-ms2	Ikke påvist						
Exo-uten PNGase F 3-ms2	Ikke påvist						
Exo-med PNGase F 1ms2	X,x	x.x	Grønn, x	X	1	11,91	2,88
Exo-med PNGase F 2ms2	Grønn, Grønn	X,grønn	Grønn, x	X	3	10,96	9,55
Exo-med PNGase F 3ms2	x.x	x.grønn	x.x	x	1	5,19	2,88
Exo-uten PNGase F 1-ms3	x.x	x.x	x.x	x	1	6,13	13,83
Exo-uten PNGase F 2-ms3	x.x	x.x	X,x	x	2	7,02	5,24
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X,x	X,x	X,x	x	2	8,90	8,38

Exo-med PNGase F 1ms3	x,x	x.grønn	Grønn,x	X	2	6,86	5,89
Exo-med PNGase F 2ms3	X,x	X,grønn	Grønn,x	x	2	12,21	5,89
Exo-med PNGase F 3ms3	Ikke påvist						

Ig alpha-1 chain C region ID P01876	N-144	N-340	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	X	3	41,17	22,66
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	X	1	21,27	23,23
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	X	1	26,02	29,80
Exo-med PNGase F 1ms1	Grønn	X	2	23,40	26,06
Exo-med PNGase F 2ms1	Grønn	X	2	24,27	22,66
Exo-med PNGase F 3ms1	Grønn	X	1	27,90	38,81
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	x	1	20,85	19,83
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	X	4	31,38	28,90
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	X	2	21,85	16,15
Exo-med PNGase F 1ms2	Grønn	X	2	27,15	28,05
Exo-med PNGase F 2ms2	Grønn	X	2	28,01	24,65
Exo-med PNGase F 3ms2	Grønn	X	3	32,04	21,25
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	X	2	27,51	29,46
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	X	3	22,43	23,51
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	X	1	14,30	23,51
Exo-med PNGase F 1ms3	Grønn	X	2	31,74	28,05
Exo-med PNGase F 2ms3	Grønn	X	2	33,35	33,71
Exo-med PNGase F 3ms3	Grønn	X	3	31,59	30,31

Angiotensin-converting enzyme ID P12821	N-38, N-54, N-74	N-111, N-146, N-160	N-318,N-445,N-509	N-677,N-695, N-714,N-760,N-942 N-1191	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	x.x.x	x.x.x	X,x,x	X,x,x,x,x,x	6	48,05	16,16
Exo-uten PNGase F 2-ms1	x.x.x	x.x.x	x.x.x	x.x.x.x.x.x	1	16,69	9,88
Exo-uten PNGase F 3-ms1	x.x.x	x.x.x	x.x.x	x.x.x.x.x.x	4	43,89	12,49
Exo-med	xxx	Rød,	X,grønn,	X,rød,grønn,grø	12	85,53	31,47

PNGase F 1ms1		rød,grønn	x	nn,x, X			
Exo-med PNGase F 2ms1	x.x.x	x.x.grønn	x.grønn, x	x.x.x.x.x.x	7	63,83	18,78
Exo-med PNGase F 3ms1	X,x,x	Rød,x,rød	X,grønn, x	X,rød,grønn,x,x, x	5	86,29	22,74
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X,x,x	x.x.x	x.x.x	x.x.x.x.x.x	6	44,57	17,29
Exo-uten PNGase F 2-ms2	x.x.x	x.x.x	x.x.x	x.x.x.x.x.x	6	61,36	19,37
Exo-uten PNGase F 3-ms2	x.x.x	x.rød.x	x.x.x	x.x.x.x.x.x	5	62,68	21,13
Exo-med PNGase F 1ms2	x.x.x	x.x.rød	x.rød,x	x.xgrønn,x.x.x	6	64,72	20,44
Exo-med PNGase F 2ms2	x,x,x	Rød,x,grøn n	X,grønn, x	X,x,grønn,x,x,x	7	64,82	29,96
Exo-med PNGase F 3ms2	X,x,x	Rød,x,grøn n	X,grønn, x	x.x.grønn,x,x,x	7	64,42	22,21
Exo-uten PNGase F 1-ms3	x.x.x	x.x.x	x.x.x	x.x.x.x.x.x	5	42,07	16,85
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X,x,x	x.x.x	x.x.x	x.x.x.x.x.x	7	37,78	17,38
Exo-uten PNGase F 3-ms3	x.x.x	x.x.x	x.x.x	x.x.x.x.x.x	4	32,67	13,71
Exo-med PNGase F 1ms3	x.x.x	Rød,x,grøn n	x.grønn. x	x.rød.grønn,x,rø d.x	8	73,31	29,25
Exo-med PNGase F 2ms3	x.x.x	x.x.grønn	x.x.x	X,rød	10	69,77	21,40
Exo-med PNGase F 3ms3	x.x.x	Rød,x, grønn	X,grønn, x	X,rød,x,x,x,x	8	66,71	22,01

Semenogelin-2 ID Q02383	N-272	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	Grønn	47	1488,49	89,52
Exo-uten PNGase F 2-ms1	Rød	37	1222,97	86,77
Exo-uten PNGase F 3-ms1	Rød	37	1424,87	87,46
Exo-med PNGase F 1ms1	Grønn	51	1526,52	89,18
Exo-med PNGase F 2ms1	Grønn	50	1540,08	90,38
Exo-med PNGase F 3ms1	Rød	39	1760,53	90,38
Exo-uten PNGase F 1-ms2	Grønn	45	1448,07	89,69
Exo-uten PNGase F 2-ms2	Grønn	47	1459,00	88,32
Exo-uten PNGase F 3-ms2	Rød	1524,82	38	89,69
Exo-med PNGase F 1ms2	Grønn	1521,63	42	89,35
Exo-med PNGase F 2ms2	Grønn	1728,78	51	95,36
Exo-med PNGase F 3ms2	Grønn	1675,84	55	90,38
Exo-uten PNGase F 1-ms3	Grønn	1535,75	49	89,69
Exo-uten PNGase F 2-ms3	Grønn	1398,59	52	87,94
Exo-uten PNGase F 3-ms3	Grønn	1343,06	47	88,32
Exo-med PNGase F 1ms3	Grønn	1591,93	52	90,72
Exo-med PNGase F 2ms3	Grønn	1697,83	52	90,72
Exo-med PNGase F 3ms3	Grønn	1639,80	52	90,38

Basal cell adhesion molecule ID P50895	N-321	N-377, N-383	N-419 N-439	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	Ikke påvist					
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	X,x	X, x	1	4,71	6,53
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	X,x	X, x	1	8,11	12,74
Exo-med PNGase F 1ms1	X	Rød, rød	X, Grønn	2	29,13	23,57
Exo-med PNGase F 2ms1	X	Rød, rød	X, Grønn	2	16,95	17,52
Exo-med PNGase F 3ms1	X	Rød, rød	X, Grønn	2	28,35	20,22
Exo-uten PNGase F 1-ms2	Ikke påvist					
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	Rød, rød	X, X	1	18,41	21,34
Exo-uten PNGase F 3-ms2	Ikke påvist					
Exo-med PNGase F 1ms2	X	Rød, rød	X, Rød	1	25,08	20,22
Exo-med PNGase F 2ms2	X	Rød, rød	X, Grønn	2	27,09	17,52
Exo-med PNGase F 3ms2	Rød	Rød, rød	X,	2	30,77	26,11

			Grønn			
Exo-uten PNGase F 1-ms3	x	X,x	X, x	1	8,43	15,45
Exo-uten PNGase F 2-ms3	Rød	X,x	X, X	2	21,07	20,54
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	X, x	X, x	1	9,87	10,83
Exo-med PNGase F 1ms3	X	Grønn, grønn	X, grønn	3	33,94	17,52
Exo-med PNGase F 2ms3	x	Rød, rød	X, Grønn	2	27,77	19,59
Exo-med PNGase F 3ms3	x	Grønn, grønn	X, Grønn	3	27,49	15,13

Aquaporin-1 ID P29972	N-42	N-205	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	Grønn	7	233,83	52,79
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	Grønn	5	187,12	52,42
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	Grønn	7	244,13	50,56
Exo-med PNGase F 1ms1	X	Grønn	8	306,77	50,56
Exo-med PNGase F 2ms1	X	Grønn	7	263,64	50,19
Exo-med PNGase F 3ms1	x	Grønn	7	263,64	50,19
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	Grønn	8	240,76	52,42
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	Grønn	9	233,42	52,79
Exo-uten PNGase F 3-ms2	x	Grønn	7	235,63	52,42
Exo-med PNGase F 1ms2	Rød	Grønn	7	236,08	68,77
Exo-med PNGase F 2ms2	x	Grønn	7	232,00	52,42
Exo-med PNGase F 3ms2	x	Grønn	7	241,73	50,56
Exo-uten PNGase F 1-ms3	Rød	Grønn	9	209,96	82,90
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	Grønn	6	113,46	52,79
Exo-uten PNGase F 3-ms3	x	Grønn	4	150,15	50,19
Exo-med PNGase F 1ms3	X	Grønn	7	249,61	52,42
Exo-med PNGase F 2ms3	X	Grønn	7	214,97	52,42
Exo-med PNGase F 3ms3	X	Grønn	7	246,79	50,56

Uroplakin-2 ID O00526	N-28	N-57	N-66	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	X	X	2	20,90	20,65
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	X	X	2	22,09	16,30
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	X	X	2	22,41	21,20
Exo-med PNGase F 1ms1	X	X	X	2	18,17	21,20

Exo-med PNGase F 2ms1	X	X	X	2	16,82	16,30
Exo-med PNGase F 3ms1	X	X	X	2	21,67	20,65
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	X	X	2	20,34	20,65
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	X	X	2	26,45	38,04
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	X	X	2	22,19	20,65
Exo-med PNGase F 1ms2	X	X	X	2	19,93	20,65
Exo-med PNGase F 2ms2	X	X	X	2	18,76	20,65
Exo-med PNGase F 3ms2	X	X	X	2	17,45	16,30
Exo-uten PNGase F 1-ms3	x	x	X	2	16,94	20,65
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	X	X	2	23,79	20,65
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	X	X	2	22,00	21,20
Exo-med PNGase F 1ms3	X	X	X	2	15,87	40,22
Exo-med PNGase F 2ms3	x	x	X	2	21,74	16,30
Exo-med PNGase F 3ms3	x	x	X	2	18,42	20,65

Solute carrier family 12 member 1 ID Q13621	N-446	N-456	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	x	X	14	193,46	33,58
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	X	7	144,65	30,48
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	X	15	256,64	35,49
Exo-med PNGase F 1ms1	X	X	16	207,32	33,48
Exo-med PNGase F 2ms1	X	X	13	200,21	35,30
Exo-med PNGase F 3ms1	X	X	8	198,18	35,40
Exo-uten PNGase F 1-ms2	Rød	Rød	14	223,98	44,90
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	X	16	223,28	39,76
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	X	14	260,11	36,76
Exo-med PNGase F 1ms2	X	X	11	200,48	33,12
Exo-med PNGase F 2ms2	X	X	12	207,11	38,22
Exo-med PNGase F 3ms2	X	X	14	193,54	31,12
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	X	17	227,43	39,22
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	X	18	201,69	34,94
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	X	17	225,66	40,04
Exo-med PNGase F 1ms3	X	X	14	163,82	30,03
Exo-med PNGase F 2ms3	X	X	14	203,13	31,39
Exo-med PNGase F 3ms3	X	X	14	187,57	35,76

CD9 antigen ID P21926	N-52	N-53	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	X	3	60,29	27,63
Exo-uten PNGase F 2-ms1	Ikke påvist				
Exo-uten PNGase F 3-ms1	x	x	1	44,27	25,44
Exo-med PNGase F 1ms1	X	X	3	62,59	25,44
Exo-med PNGase F 2ms1	x	X	3	58,56	25,44
Exo-med PNGase F 3ms1	X	x	2	58,85	25,44
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	x	2	51,10	27,63
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	X	2	43,71	25,44
Exo-uten PNGase F 3-ms2	x	x	1	49,29	57,02
Exo-med PNGase F 1ms2	X	X	2	67,72	25,44
Exo-med PNGase F 2ms2	X	X	2	56,35	25,44
Exo-med PNGase F 3ms2	X	x	3	54,97	25,44
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	X	3	52,26	42,43
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	X	3	44,98	25,44
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	X	2	45,53	25,44
Exo-med PNGase F 1ms3	X	X	3	56,05	25,44
Exo-med PNGase F 2ms3	x	x	3	57,58	25,44
Exo-med PNGase F 3ms3	x	x	3	57,86	25,44

Alpha-1-antitrypsin ID P01009	N-70	N-107	N-271	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	X	X	1	15,00	5,56
Exo-uten PNGase F 2-ms1	Ikke påvist					
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	X	X	2	10,70	13,37
Exo-med PNGase F 1ms1	X	Rød	X	1	10,17	16,01
Exo-med PNGase F 2ms1	X	Grønn	X	2	11,04	23,68
Exo-med PNGase F 3ms1	X	Grønn	X	2	29,83	16,01
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	x	X	1	4,49	14,83
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	X	X	1	13,88	5,56
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	X	X	2	19,37	15,60
Exo-med PNGase F 1ms2	x	x	X	1	12,10	18,63
Exo-med PNGase F 2ms2	X	x	X	1	15,89	18,63
Exo-med PNGase F 3ms2	X	Grønn	X	2	24,64	16,01
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	X	X	1	7,95	16,01
Exo-uten PNGase F 2-ms3	x	X	X	1	8,43	5,56
Exo-uten PNGase F 3- ms3	x	x	X	1	4,24	5,56
Exo-med PNGase F 1ms3	Grønn	Rød	X	2	17,31	33,99

Exo-med PNGase F 2ms3	X	Grønn	X	2	29,43	18,63
Exo-med PNGase F 3ms3	X	Grønn	Rød	2	20,03	26,14

Choline transporter-like protein 4 (isoform 3) ID Q53GD3-3	N-69	N-155, N-197	N-298, N-393	N-405, N-416	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	x	X,x	X,x	X,x	1	7,87	6,62
Exo-uten PNGase F 2-ms1	x	X,x	X,x	X,x	1	4,27	10,73
Exo-uten PNGase F 3-ms1	Ikke påvist						
Exo-med PNGase F 1ms1	Grønn	X,x,	X,x	X,x	2	18,45	16,56
Exo-med PNGase F 2ms1	x	X,x	X,x	X,x	1	7,63	11,69
Exo-med PNGase F 3ms1	Grønn	x.x	x.x	x.x	2	14,48	12,62
Exo-uten PNGase F 1-ms2	x	X,x	X,x	X,x	1	8,13	5,05
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	X,x	X,x	X,x	1	3,06	6,62
Exo-uten PNGase F 3-ms2	Ikke påvist						
Exo-med PNGase F 1ms2	X	x.x	X,x	X,x	1	16,34	17,03
Exo-med PNGase F 2ms2	Grønn	x.x	x.x	x.x	2	16,08	14,04
Exo-med PNGase F 3ms2	X	X,x	X,x	X,x	2	14,10	12,62
Exo-uten PNGase F 1-ms3	x	X,x	X,x	X,x	1	8,02	2,21
Exo-uten PNGase F 2-ms3	Ikke påvist						
Exo-uten PNGase F 3-ms3	x	X,x	X,x	X,x	1	4,01	3,63
Exo-med PNGase F 1ms3	rød	Grønn,x	x.x	x.x	2	15,39	12,25
Exo-med PNGase F 2ms3	Grønn	x.x	X,x	x.x	2	14,64	11,36
Exo-med PNGase F 3ms3	Grønn	x.x.	x.x	x.x	2	15,08	10,88

Aquaporin-2 ID P41181	N-123	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	4	95,22	37,27
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	2	85,53	26,94
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	3	93,80	26,94
Exo-med PNGase F 1ms1	X	4	101,82	26,94
Exo-med PNGase F 2ms1	X	2	73,89	26,94
Exo-med PNGase F 3ms1	X	2	86,01	22,14
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	3	90,22	22,14
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	3	67,46	26,94
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	2	45,60	26,94
Exo-med PNGase F 1ms2	X	2	72,61	26,94
Exo-med PNGase F 2ms2	X	2	41,32	26,94
Exo-med PNGase F 3ms2	X	3	52,98	26,94
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	2	67,87	26,94
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	3	34,44	22,14
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	2	41,12	26,94
Exo-med PNGase F 1ms3	X	3	73,18	22,14
Exo-med PNGase F 2ms3	X	2	44,41	22,14
Exo-med PNGase F 3ms3	X	2	50,45	22,14

Mannosyl-oligosaccharide 1,2- alpha-mannosidase IA ID P33908	N-513	Antall unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	4	35,78	26,34
Exo-uten PNGase F 2-ms1	Ikke påvist			
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	3	41,99	22,51
Exo-med PNGase F 1ms1	X	4	23,79	19,30
Exo-med PNGase F 2ms1	X	2	17,86	13,48
Exo-med PNGase F 3ms1	X	3	23,13	17,15
Exo-uten PNGase F 1-ms2	Rød	3	30,46	23,43
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	4	35,04	19,14
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	3	29,31	21,29
Exo-med PNGase F 1ms2	X	1	12,57	19,45
Exo-med PNGase F 2ms2	Rød	2	14,45	15,62
Exo-med PNGase F 3ms2	X	2	17,66	17,15
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	2	24,00	14,09
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	4	29,97	14,40
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	4	32,07	19,91
Exo-med PNGase F 1ms3	X	3	22,96	24,50
Exo-med PNGase F 2ms3	X	3	23,61	18,22

Exo-med PNGase F 3ms3	X	3	24,64	13,48
------------------------------	----------	----------	--------------	--------------

Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A ID P62937	N-108	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	2	35,84	26,67
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	2	37,05	30,30
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	2	39,04	34,55
Exo-med PNGase F 1ms1	X	2	37,55	33,94
Exo-med PNGase F 2ms1	X	2	30,55	23,03
Exo-med PNGase F 3ms1	X	2	30,56	23,03
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	2	33,54	30,91
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	2	45,06	34,55
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	2	34,06	23,03
Exo-med PNGase F 1ms2	X	2	35,87	23,03
Exo-med PNGase F 2ms2	X	2	36,29	36,29
Exo-med PNGase F 3ms2	X	3	24,54	23,03
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	2	29,62	30,91
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	3	39,63	30,91
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	3	38,54	30,91
Exo-med PNGase F 1ms3	X	2	27,28	26,67
Exo-med PNGase F 2ms3	X	4	32,58	30,30
Exo-med PNGase F 3ms3	X	2	25,74	26,67

Prostate stem cell antigen ID O43653	N-40	N-83	N-93	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	X	X	1	43,61	22,76
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	Rød	Rød	2	48,93	56,10
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	X	X	2	48,64	22,76
Exo-med PNGase F 1ms1	X	X	X	4	60,31	22,76
Exo-med PNGase F 2ms1	X	X	X	3	50,77	22,76
Exo-med PNGase F 3ms1	X	X	X	3	53,17	22,76
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	X	X	3	61,06	22,76
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	X	X	3	48,87	22,76
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	X	X	1	42,36	22,76

Exo-med PNGase F 1ms2	X	X	X	3	48,45	22,76
Exo-med PNGase F 2ms2	X	X	X	3	46,83	22,76
Exo-med PNGase F 3ms2	X	X	X	3	48,03	22,76
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	X	X	2	46,91	22,76
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	X	X	3	46,94	22,76
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	X	X	3	51,91	22,76
Exo-med PNGase F 1ms3	X	X	X	3	56,31	22,76
Exo-med PNGase F 2ms3	X	X	X	3	51,47	22,76
Exo-med PNGase F 3ms3	X	x	X	3	58,82	22,76

Multidrug resistance protein 1 ID P08183	N-91	N-94	N-99	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	x	x	5	37,55	10,63
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	X	x	1	18,86	9,84
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	X	X	5	42,31	9,92
Exo-med PNGase F 1ms1	X	X	X	5	37,52	11,41
Exo-med PNGase F 2ms1	X	X	x	5	38,21	12,11
Exo-med PNGase F 3ms1	X	X	X	3	36,08	10,70
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	X	X	4	32,35	9,30
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	X	x	6	47,75	13,20
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	X	x	5	53,01	13,93
Exo-med PNGase F 1ms2	X	X	x	4	32,71	9,45
Exo-med PNGase F 2ms2	X	X	Rød	4	41,13	16,41
Exo-med PNGase F 3ms2	X	X	x	5	38,13	9,77
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	X	X	6	53,43	9,77
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	X	x	7	37,64	13,13
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	X	x	4	31,31	8,38
Exo-med PNGase F 1ms3	X	X	Rød	5	40,91	11,88
Exo-med PNGase F 2ms3	X	X	X	5	41,96	9,45
Exo-med PNGase F 3ms3	X	X	X	5	35,37	9,77

CD59 glycoprotein ID P13987	N-43	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	6	116,73	28,13

Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	4	129,86	28,13
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	4	123,47	28,13
Exo-med PNGase F 1ms1	X	6	142,75	28,13
Exo-med PNGase F 2ms1	X	5	139,32	28,13
Exo-med PNGase F 3ms1	X	4	139,39	28,13
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	4	134,04	28,13
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	5	150,60	28,13
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	4	133,42	28,13
Exo-med PNGase F 1ms2	X	5	139,28	28,13
Exo-med PNGase F 2ms2	X	5	136,52	28,13
Exo-med PNGase F 3ms2	X	6	122,34	28,13
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	6	129,67	28,13
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	7	143,83	28,13
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	5	133,52	28,13
Exo-med PNGase F 1ms3	X	6	152,19	28,13
Exo-med PNGase F 2ms3	X	6	142,03	28,13
Exo-med PNGase F 3ms3	X	5	129,31	28,13

Ammonium transporter Rh type C ID Q9UBD6	N-48	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	4	111,13	24,63
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	2	38,13	16,70
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	3	65,67	19,83
Exo-med PNGase F 1ms1	X	4	98,79	27,35
Exo-med PNGase F 2ms1	X	3	40,33	19,42
Exo-med PNGase F 3ms1	X	4	103,25	19,42
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	3	69,49	27,35
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	2	55,58	17,12
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	4	100,31	19,42
Exo-med PNGase F 1ms2	X	4	61,85	19,42
Exo-med PNGase F 2ms2	X	3	59,48	11,90
Exo-med PNGase F 3ms2	X	3	73,72	11,90
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	3	66,51	11,90
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	2	21,41	17,12
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	3	21,86	17,12
Exo-med PNGase F 1ms3	X	3	90,45	19,83
Exo-med PNGase F 2ms3	X	3	61,75	24,84
Exo-med PNGase F 3ms3	X	3	75,12	11,90

G-protein coupled receptor family C group 5 member C ID Q9NQ84	N-191	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	2	36,25	14,06

Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	1	37,83	19,95
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	2	34,21	14,06
Exo-med PNGase F 1ms1	X	3	31,63	12,2
Exo-med PNGase F 2ms1	X	2	36,01	14,06
Exo-med PNGase F 3ms1	X	2	34,04	14,06
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	2	43,55	19,95
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	2	35,33	13,61
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	2	38,45	14,06
Exo-med PNGase F 1ms2	X	2	40,80	16,55
Exo-med PNGase F 2ms2	X	3	27,75	22,9
Exo-med PNGase F 3ms2	X	2	27,48	14,06
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	3	44,82	19,95
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	4	44,05	16,55
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	3	33,13	16,55
Exo-med PNGase F 1ms3	X	2	30,61	14,06
Exo-med PNGase F 2ms3	X	3	36,15	14,06
Exo-med PNGase F 3ms3	X	3	34,04	14,06

Transmembrane protease serine 2 ID O15393	N-213	N-249	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	X	3	16,06	11,59
Exo-uten PNGase F 2-ms1	Ikke påvist				
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	X	2	19,60	25,20
Exo-med PNGase F 1ms1	X	X	3	35,04	16,67
Exo-med PNGase F 2ms1	X	X	3	28,34	19,92
Exo-med PNGase F 3ms1	x	X	3	28,04	14,63
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	X	1	14,50	16,67
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	X	3	27,11	14,63
Exo-uten PNGase F 3-ms2	x	X	3	34,63	21,14
Exo-med PNGase F 1ms2	X	X	3	27,94	16,67
Exo-med PNGase F 2ms2	X	X	4	35,16	16,67
Exo-med PNGase F 3ms2	x	x	2	13,39	9,76
Exo-uten PNGase F 1-ms3	x	x	3	22,58	13,41
Exo-uten PNGase F 2-ms3	x	x	3	21,21	13,41
Exo-uten PNGase F 3-ms3	x	x	1	8,18	11,99
Exo-med PNGase F 1ms3	X	X	4	13,37	16,67
Exo-med PNGase F 2ms3	X	X	4	38,02	19,92
Exo-med PNGase F 3ms3	X	X	2	17,63	9,67

Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5 ID P22732	N-51	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	3	87,39	15,97
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	2	70,68	15,97
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	3	104,09	15,97
Exo-med PNGase F 1ms1	X	3	66,50	11,78
Exo-med PNGase F 2ms1	X	3	79,13	11,78
Exo-med PNGase F 3ms1	X	2	72,78	11,78
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	4	88,04	19,16
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	4	83,75	15,97
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	2	96,79	15,97
Exo-med PNGase F 1ms2	X	3	76,48	11,78
Exo-med PNGase F 2ms2	X	3	72,01	11,78
Exo-med PNGase F 3ms2	X	3	67,75	11,78
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	5	102,78	19,36
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	4	85,45	16,17
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	4	77,44	15,97
Exo-med PNGase F 1ms3	X	4	76,01	13,17
Exo-med PNGase F 2ms3	X	3	75,80	14,97
Exo-med PNGase F 3ms3	X	2	64,79	11,78

Integral membrane protein 2B ID Q9Y287	N-170	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	2	31,05	35,34
Exo-uten PNGase F 2-ms1	x	1	4,19	22,56
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	4	35,23	26,32
Exo-med PNGase F 1ms1	X	1	9,58	22,56
Exo-med PNGase F 2ms1	X	1	12,15	22,56
Exo-med PNGase F 3ms1	X	2	16,51	22,56
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	3	24,40	22,56
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	1	10,11	22,56
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	3	32,10	30,08
Exo-med PNGase F 1ms2	X	1	22,43	22,56
Exo-med PNGase F 2ms2	X	2	26,15	27,82
Exo-med PNGase F 3ms2	X	1	28,45	22,56
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	2	26,01	22,56

Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	2	9,20	26,32
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	2	20,78	22,56
Exo-med PNGase F 1ms3	X	1	16,39	22,56
Exo-med PNGase F 2ms3	X	2	16,76	22,56
Exo-med PNGase F 3ms3	X	2	16,34	22,56

G-protein coupled receptor family C group 5 member B ID Q9NZH0	N-30	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	3	28,50	14,64
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	1	23,06	15,63
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	2	36,88	16,87
Exo-med PNGase F 1ms1	X	3	34,48	16,87
Exo-med PNGase F 2ms1	X	2	29,33	14,64
Exo-med PNGase F 3ms1	x	1	30,36	14,64
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	1	23,08	14,64
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	3	34,04	17,37
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	2	30,30	16,87
Exo-med PNGase F 1ms2	X	3	36,12	15,14
Exo-med PNGase F 2ms2	X	2	19,94	17,37
Exo-med PNGase F 3ms2	X	3	20,86	14,64
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	3	36,96	24,07
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	3	24,51	16,87
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	2	29,25	17,37
Exo-med PNGase F 1ms3	X	3	31,23	14,64
Exo-med PNGase F 2ms3	X	3	27,19	14,64
Exo-med PNGase F 3ms3	X	1	26,38	16,87

Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A ID P62937	N-108	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	2	35,84	26,67
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	2	37,05	30,30
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	2	39,04	34,55
Exo-med PNGase F 1ms1	X	2	37,55	33,94

Exo-med PNGase F 2ms1	X	2	30,55	23,03
Exo-med PNGase F 3ms1	X	2	30,56	23,03
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	2	33,54	30,91
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	3	45,06	34,55
Exo-uten PNGase F 3-ms2	X	2	34,06	23,03
Exo-med PNGase F 1ms2	X	2	35,87	23,03
Exo-med PNGase F 2ms2	X	2	36,29	30,30
Exo-med PNGase F 3ms2	x	3	34,54	23,03
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	2	29,62	30,91
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	3	39,63	30,91
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	3	38,54	30,91
Exo-med PNGase F 1ms3	X	2	27,28	26,67
Exo-med PNGase F 2ms3	X	4	32,58	30,30
Exo-med PNGase F 3ms3	X	2	25,74	26,67

Prostasin ID Q16651	N-159	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	X	1	16,64	9,62
Exo-uten PNGase F 2-ms1	X	1	7,07	4,08
Exo-uten PNGase F 3-ms1	X	2	16,74	9,62
Exo-med PNGase F 1ms1	X	1	13,83	16,33
Exo-med PNGase F 2ms1	X	2	15,90	9,62
Exo-med PNGase F 3ms1	Ikke påvist			
Exo-uten PNGase F 1-ms2	X	2	16,16	9,62
Exo-uten PNGase F	X	1	12,85	9,62

2-ms2				
Exo-uten PNGase F 3-ms2	Ikke påvist			
Exo-med PNGase F 1ms2	X	1	12,93	14,29
Exo-med PNGase F 2ms2	X	1	16,64	19,83
Exo-med PNGase F 3ms2	X	2	15,33	14,29
Exo-uten PNGase F 1-ms3	X	2	15,98	9,62
Exo-uten PNGase F 2-ms3	X	1	12,50	4,08
Exo-uten PNGase F 3-ms3	X	1	11,96	4,08
Exo-med PNGase F 1ms3	X	1	12,41	14,29
Exo-med PNGase F 2ms3	X	2	20,49	14,29
Exo-med PNGase F 3ms3	X	1	13,02	4,08

Carboxypeptidase M ID P14384	N-38	N-115, N-164	N- 363	N- 384	Antall påviste unike peptider	Score	Coverage i %
Exo-uten PNGase F 1-ms1	Ikke påvist						
Exo-uten PNGase F 2-ms1	Ikke påvist						
Exo-uten PNGase F 3-ms1	Ikke påvist						
Exo-med PNGase F 1ms1	X	Grønn, x	rød	X	1	20,87	12,64
Exo-med PNGase F 2ms1	X	Grønn, x	X	X	1	21,42	6,32
Exo-med PNGase F 3ms1	X	Grønn,x	Rød	X	2	23,78	22,80
Exo-uten PNGase F 1-ms2	Ikke påvist						
Exo-uten PNGase F 2-ms2	X	X,x	x	x	1	5,61	6,09
Exo-uten PNGase F 3-ms2	Ikke påvist						
Exo-med PNGase F 1ms2	Rød	Grønn, x	X	x	1	11,31	10,16

Exo-med PNGase F 2ms2	X	Grønn, x	X	X	1	22,39	6,32
Exo-med PNGase F 3ms2	Rød	Grønn,x	Rød	Rød	2	24,00	26,64
Exo-uten PNGase F 1-ms3	Ikke påvist						
Exo-uten PNGase F 2-ms3	Ikke påvist						
Exo-uten PNGase F 3-ms3	Ikke påvist						
Exo-med PNGase F 1ms3	X	Grønn, x	x	x	1	11,31	6,32
Exo-med PNGase F 2ms3	X	Grønn, x	x	x	1	26,59	15,58
Exo-med PNGase F 3ms3	Rød	Grønn, x	x	x	1	12,82	10,16

