

**Einzigartig vernetzt -**  
**Strukturelle Charakterisierung des Faserproteins Elastin**  
**mittels Massenspektrometrie**

Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,



vorgelegt

von Herrn M. Sc. **Christoph Schröder**

geb. am 01.07.1988 in Georgsmarienhütte

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. Reinhard Neubert
2. Prof. Dr. Mike Schutkowski
3. Prof. Dr. Michael Linscheid

öffentlich verteidigt am 16.03.2016, Halle (Saale)



### **Danksagung**

Wissenschaft ist Teamarbeit und auch diese Dissertation wäre ohne die vielfältige Hilfe und Unterstützung von Freunden, Familie und Kollegen nicht möglich gewesen. Daher möchte ich an dieser Stelle all den Personen danken, die - in welcher Form auch immer - zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

Mein größter Dank gilt Dr. Christian Schmelzer für sein stetiges Engagement, der mich mit seiner enormen Kompetenz in die Tiefen der Massenspektrometrie eingeführt hat, und jederzeit ein offenes Ohr für Diskussionen hatte. Weiterhin möchte ich mich für das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken, das es mir ermöglichte, eigene Ideen fortwährend einzubringen und weiterzuverfolgen! Es hat wirklich Spaß gemacht an diesem interessanten und herausfordernden Thema zu arbeiten!

Prof. Dr. Dr. Reinhard Neubert danke ich für eine herzliche Aufnahme in die AG Biopharmazie und die ununterbrochene Unterstützung während der Anfertigung meiner Arbeit.

Prof. Dr. Mike Schutkowski und Prof. Dr. Michael Linscheid danke ich herzlich für die Übernahme des Zweit- bzw. Drittgutachtens der Arbeit.

Dr. Andrea Heinz danke ich für das fortwährende Interesse an meiner Arbeit, die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft, stetige Diskussionsbereitschaft und das kritische Lesen der vorliegenden Arbeit.

Dr. Günther Jahreis danke ich herzlich für kompetente Peptidsynthesen und kritische Diskussionen. Prof. Anthony S. Weiss und Dr. Alex G. Harrison möchte ich für das Interesse an meiner Arbeit und ihre wertvollen Kommentare und Ideen danken. Dr. Stéphanie Baud möchte ich für die Einweisung in die Welt der Moleküldynamik und die fürsorgliche Betreuung während meiner Zeit in Reims danken. Prof. Wolfgang Sippl und Berin Karaman danke ich für die exzellente Zusammenarbeit in Hinblick auf molekulare Dockingsimulationen.

Weiterhin gilt großer Dank Dr. Wolfgang Hoehenwarter und Petra Majovsky für die Unterstützung und Durchführung bei der massenspektrometrischen Analyse an der Orbitrap Velos Pro. Dieser Dank gilt ebenso Dr. Christian Ihling für Messungen an der Orbitrap Fusion.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich den Boehringer Ingelheim Fonds und dem Deutschen Akademischen Auslandsdienst, die es mir erlaubt haben, auch außerhalb der Stadt Halle

## Danksagung

---

neue analytische Methoden zu erlernen und meinen Horizont zu erweitern. Der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. danke ich für den großzügigen Preis im Rahmen der 22. Arbeitstagung.

Katharina Gerth danke ich für das kritische Lesen der Arbeit und für gemeinsame Stunden in der Mensa, die den Unialltag definitiv belebt haben. Großer Dank gilt weiterhin Martin Köhler für das Lesen der Arbeit und dafür, dass sowohl fachspezifische als auch fachfremde Themen mit ihm wunderbar diskutiert werden können.

Allen Mitgliedern der AG Biopharmazie danke ich für ein freundliches Arbeitsklima während meiner Promotionszeit. Frau Woigk möchte ich für eine angenehme Atmosphäre im Labor und für ihre Hilfsbereitschaft danken!

Mein innigster Dank gilt jedoch meiner Freundin Kathleen sowie meiner tollen Familie (Phil, Suse, Judith, Antonia, Beate und meinen Eltern), die mich zu jedem Zeitpunkt während der letzten Jahre bedingungslos unterstützt haben und es auch hoffentlich weiterhin tun.



## **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>DANKSAGUNG</b>	<b>III</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>IX</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>XVI</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>XX</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>XXI</b>
<b>1 THEORETISCHER HINTERGRUND</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Biologischer Hintergrund</b>	<b>1</b>
1.1.1 Die extrazelluläre Matrix als multifunktionales Gewebegrundgerüst bei Wirbeltieren 1	
1.1.2 Elastische Fasern – Struktur und Funktion	4
1.1.3 Biochemische und physikalische Eigenschaften von Elastin	6
<b>1.2 Grundlagen der Massenspektrometrie</b>	<b>12</b>
1.2.1 Aufbau eines Massenspektrometers	13
1.2.2 MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer	15
1.2.3 Kopplung von chromatographischen Methoden mit ESI- MS	17
1.2.4 NanoESI-QqTOF Massenspektrometer	18
1.2.5 NanoESI-Orbitrap Massenspektrometer	19
<b>1.3 Massenspektrometrie in der Proteinanalytik</b>	<b>23</b>
1.3.1 Identifizierung von Proteinen und Peptiden	23
1.3.2 Identifizierung posttranslational modifizierter Peptide	26
1.3.3 Quervernetzte Peptide und deren massenspektrometrische Identifizierung	28
<b>2 ZIELSTELLUNG</b>	<b>31</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Material</b>	<b>32</b>

3.1.1 Chemikalien	32
3.1.2 Laufmittel, Lösungen und Puffer	33
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	34
3.1.4 Enzyme, Proteine, Peptide und Aminosäuren	34
3.1.5 Gewebeproben	35
3.1.6 Laborgeräte	36
3.1.7 Chromatographie	36
3.1.8 Massenspektrometer	37
3.1.9 Datenverarbeitung	37
<b>3.2 Biochemische Methoden</b>	<b>38</b>
3.2.1 Derivatisierung von Desmosin und Isodesmosin	38
3.2.2 Isolation von Elastin aus tierischem Gewebe	40
3.2.3 Totalhydrolyse zur Freisetzung von Desmosin und Isodesmosin	41
3.2.4 <i>In vitro</i> Quervernetzung von Tropoelastin	41
3.2.5 Enzymatische Verdaue in Lösung	42
3.2.6 Fraktionierung hydrophiler Peptide	42
3.2.7 Entsalzung enzymatischer Verdaue	43
<b>3.3 Analytische Methoden</b>	<b>43</b>
3.3.1 Quantifizierung von Desmosin und Isodesmosin an der LC-ESI-LCQ Ionenfalle	43
3.3.2 <i>Offline</i> -gekoppeltes nanoLC-MALDI-TOF/TOF MS	43
3.3.3 Statische Messungen am nanoESI-QqTOF Massenspektrometer	44
3.3.4 Statische Messungen am nanoESI-LTQ-Orbitrap Velos Pro Massenspektrometer	45
3.3.5 NanoLC-nanoESI-LTQ-Orbitrap Velos Pro Massenspektrometrie	45
3.3.6 NanoLC-nanoESI-Orbitrap Fusion Tribrid Massenspektrometrie	46
<b>3.4 Bioinformatische Methoden</b>	<b>47</b>
3.4.1 Sequenzierung linearer Peptide	47
3.4.2 Sequenzierung intrapeptidal bifunktional quervernetzter Peptide	48
3.4.3 Sequenzierung interpeptidal bifunktional quervernetzter Peptide	48
3.4.4 Identifizierung und Sequenzierung tetrafunktional quervernetzter Peptide	49
3.4.5 Moleküldynamiksimulationen bifunktional quervernetzter Peptide	50
3.4.6 Molekulares Docking	51

3.4.7 Bestimmung der Spaltspezifität von Proteasen	51
<b>4 ERGEBNISSE</b>	<b>52</b>
<b>4.1 Elastinähnliche Biomaterialien und Tropoelastin als Modellsubstrate</b>	<b>52</b>
4.1.1 Degradation von Tropoelastin und Elastin durch verschiedener Proteasen	52
4.1.2 Massenspektrometrische Charakterisierung von quervernetztem Tropoelastin	54
4.1.3 Moleküldynamiksimulationen quervernetzter Peptide	55
<b>4.2 Methodische Entwicklungen zur Identifizierung quervernetzter Elastinpeptide</b>	<b>58</b>
4.2.1 Kollisionsinduzierte Dissoziation von Lysinonorleucin	58
4.2.2 Kollisionsinduzierte Dissoziation von Desmosin und Isodesmosin sowie deren Derivaten	59
4.2.3 Entwicklung einer Methode zur Identifizierung DES/IDES-enhaltender Peptide	65
<b>4.3 Molekulare Charakterisierung von Elastin isoliert aus <i>Bos taurus</i></b>	<b>71</b>
4.3.1 Lineare Peptide	71
4.3.2 Bifunktional quervernetzte Peptide	73
4.3.3 Tetrafunktional quervernetzte Peptide	75
4.3.4 Molekulares Docking eines tetrafunktional quervernetzten Peptides mit PE	77
4.3.5 Übersicht	79
<b>4.4 Molekulare Charakterisierung von Elastin isoliert aus <i>Homo sapiens</i></b>	<b>81</b>
4.4.1 Lineare Peptide	81
4.4.2 Bifunktional quervernetzte Peptide	84
4.4.3 Tetrafunktional quervernetzte Peptide	86
4.4.4 Übersicht	88
<b>4.5 Molekulare Charakterisierung von Elastin isoliert aus <i>Xenopus tropicalis</i></b>	<b>90</b>
4.5.1 Lineare Peptide	91
4.5.2 Bifunktional quervernetzte Peptide	96
4.5.3 Übersicht	98
<b>5 DISKUSSION</b>	<b>101</b>
<b>5.1 Proteolytische Aktivität von Proteasen gegenüber Tropoelastin und Elastin</b>	<b>101</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

5.1.1 Abbau von Tropoelastin durch Pankreaselastase	101
5.1.2 Abbau von Tropoelastin und Elastin durch <i>Nepenthes</i> -Proteasen	102
<b>5.2 Kollisionsinduzierte Dissoziation der quervernetzenden Aminosäuren</b>	
<b>Lysinonorleucin, Desmosin und Isodesmosin</b>	<b>103</b>
<b>5.3 Identifizierung und Sequenzierung von quervernetzten Peptiden in Elastin</b>	<b>106</b>
5.3.1 Anreicherung tetrafunktional quervernetzter Peptide aus Elastin	106
5.3.2 Anreicherung bifunktional quervernetzter Peptide aus Elastin	108
5.3.3 Sequenzierung tetrafunktional quervernetzter Elastinpeptide	109
5.3.4 Tetrafunktional quervernetzter Elastinpeptide als Biomarker in der Medizin	111
5.3.5 Allgemeine Hinweise zur Sequenzierung von Elastinpeptiden	111
<b>5.4 Strukturelle Charakterisierung von nativem Elastin</b>	<b>113</b>
5.4.1 Quervernetzungen in Elastin – Allgemeine Aussagen	116
5.4.2 Die Rolle von KP- und KA-Domänen in Elastin bezüglich ihrer Involvierung in bi- und tetrafunktionale Quervernetzungen	117
5.4.3 Elastin aus <i>Xenopus tropicalis</i> – Unterschiede zu Elastin aus <i>Bos taurus</i> und <i>Homo sapiens</i>	120
<b>5.5 Weiterentwicklung des bestehenden Modells der Elastogenese</b>	<b>121</b>
<b>6 AUSBLICK</b>	<b>126</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>XXIV</b>
<b>8 ANHANG</b>	<b>XLIX</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>LXXXVIII</b>
<b>PUBLIKATIONS LISTE UND TAGUNGS BEITRÄGE</b>	<b>XC</b>
<b>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</b>	<b>XCII</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\Delta$ -LNL	Dehydrolysinonorleucin
AA	Allysinaldol
ACN	Acetonitril
AGC	Automatische Verstärkungsregelung, engl. <i>automatic gain control</i>
ANAO	Aminoxidase isoliert aus dem Organismus <i>Aspergillus nidulans</i>
ANAO-TE	durch ANAO <i>in vitro</i> quervernetztes TE, IF 2
BS3	Bis(sulfosuccinimidyl)suberat
BuOH	Butanol
<i>BTA</i>	<i>Bos taurus</i>
cDNA	Komplementäre DNA, engl. <i>complementary DNA</i>
CHCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxizimtsäure, engl. <i><math>\alpha</math>-cyano-hydroxycinnamic acid</i>
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation, engl. <i>collision-induced dissociation</i>
CNBr	Cyanogenbromid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenkrankheit, engl. <i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
CTR	Chymotrypsin
DDA	Datenabhängige Aufnahme, engl. <i>data dependent acquisition</i>
DIA	Datenunabhängige Aufnahme, engl. <i>data independent acquisition</i>
DSS	Disuccinimidylsuberat
DTT	Dithiothreitol
DES	Desmosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
EBP	Elastinbindendes Protein
ECD	Elektroneneinfangdissoziation, engl. <i>electron capture dissociation</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

Elastin-Gen	<i>ELN</i>
ESI	Elektrosprayionisation, engl. <i>electrospray ionization</i>
ETD	Elektronentransferdissoziation, engl. <i>electron transfer dissociation</i>
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FA	Ameisensäure, engl. <i>formic acid</i>
FDR	Quote falsch positiver Entdeckungen, engl. <i>false discovery rate</i>
FMOC-Cl	Fluorenylmethoxycarbonylchlorid
FWHM	Halbwertsbreite, engl. <i>full width at half maximum</i>
GAG	Glykosaminoglykan
HCD	Höherenergetische Dissoziation, engl. <i>higher-energy collisional dissociation</i>
<i>HSA</i>	<i>Homo sapiens</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
IAA	Iodacetamid
IDES	Isodesmosin
IF	Isoform
LC	Flüssigkeitschromatographie, engl. <i>liquid chromatography</i>
LID	Laserinduzierte Dissoziation, engl. <i>laser-induced dissociation</i>
LMCO	Abschnitt niedriger Massen, engl. <i>low mass cut-off</i>
LTQ	Lineare Ionenfalle, engl. <i>linear trap quadrupole</i>
LNL	Lysinonorleucin
LOX	Lysyloxidase
LOXL	Lysyloxidase-ähnliche Proteine

## Abkürzungsverzeichnis

---

MAGP-1	Mikrofibrillen-assoziiertes Glykoprotein 1
MAGP-2	Mikrofibrillen-assoziiertes Glykoprotein 2
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation, engl. <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MeOH	Methanol
MGF	engl. <i>mascot generic file</i>
MMP	Matrixmetalloprotease
MS	Massenspektrometrie / Massenspektrometer
MS3D	Massenspektrometrie zur räumlichen Charakterisierung von Proteinen
MW	Molekulargewicht
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NA	Normalisierte Aktivität
NaCl	Natriumchlorid
NE	Normalisierte Kollisionsenergie, engl. <i>normalized energy</i>
NMR	Nuklearmagnetresonanzspektroskopie
PE	Pankreaselastase
PEP	Prolyl-Endopeptidase
Pr	Propionsäureanhydrid
PrCl	n-Propylchlorformiat
PSM	Peptidspektrum-Treffer, engl. <i>peptide-spectrum match</i>
PTM	Posttranslationale Modifikation
Q	Quadrupol
QqTOF	Hybridmassenspektrometer bestehend aus Quadrupol- und Flugzeitanalytator mit dazwischen befindlicher Kollisionszelle

## Abkürzungsverzeichnis

---

RMSD	Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung, engl. <i>root mean square deviation</i>
RP-LC	Umkehrphasenflüssigkeitschromatographie, engl. <i>reversed phase liquid chromatography</i>
RT	Raumtemperatur
SA	Sinapinsäure, engl. <i>sinapic acid</i>
SANS	Kleinwinkelneutronenstreuung, engl. <i>small-angle neutron scattering</i>
SAXS	Kleinwinkelröntgenstreuung, engl. <i>small-angle X-ray scattering</i>
SCX	Starke Kationenaustauschchromatographie, engl. <i>strong cation exchange</i>
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis, engl. <i>signal-to-noise ratio</i>
TE	Tropoelastin
TFA	Trifluoressigsäure, engl. <i>trifluoroacetic acid</i>
TFE	Trifluorethanol
TIC	Totalionenstrom, engl. <i>total ion current</i>
TOF	Flugzeit, engl. <i>time of flight</i>
TR	Trypsin
UV	Ultraviolett
XTR	<i>Xenopus tropicalis</i>



## Einheitenverzeichnis

Å	Ångström, 1 Å entspricht 0,1 Nanometer
bp	Basenpaar
Da	Dalton
eV	Elektronenvolt
fs	Femtosekunde
kV	Kilovolt
nm	Nanometer
ns	Nanosekunde
ppm	Teile pro Million, engl. <i>parts per million</i>
Th	Thomson

**Drei- und Einbuchstabencodes der 20 kanonischen Aminosäuren sowie Hydroxyprolin,  $\alpha$ -Aminoadipinsäure und Allysin inkl. der monoisotopischen Massen**

<b>Aminosäure</b>	<b>Dreibuch- stabencode</b>	<b>Einbuch- stabencode</b>	<b>Monoisotopische Masse – H<sub>2</sub>O [Da]</b>
$\alpha$ -Aminoadipinsäure*	Aad	-	143,0583
Alanin	Ala	A	71,0371
Allysin*	Lya	-	127,0633
Arginin	Arg	R	156,1011
Asparagin	Asn	N	114,0429
Asparaginsäure	Asp	D	115,0270
Cystein	Cys	C	103,0092
Glutamin	Gln	Q	128,0586
Glutaminsäure	Glu	E	129,0426
Glycin	Gly	G	57,0215
Histidin	His	H	137,0589
Hydroxyprolin*	Hyp	-	113,0477
Isoleucin	Ile	I	113,0841
Leucin	Leu	L	113,0841
Lysin	Lys	K	128,0950
Methionin	Met	M	131,0405
Phenylalanin	Phe	F	147,0684
Prolin	Pro	P	97,0528
Serin	Ser	S	87,0320
Threonin	Thr	T	101,0477
Tryptophan	Trp	W	186,0793
Tyrosin	Tyr	Y	163,0633
Valin	Val	V	99,0684

\* Aminosäuren, die in Elastin durch posttranslationale Modifikationen entstehen.

**Abundante Quervernetzungsamino­säuren in Elastin**

<b>Aminosäure</b>	<b>Quervernetzungstyp</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Monoisotopische Masse [Da]</b>
Allysinaldol	bifunktional	AA	272,2371
Lysinonorleucin	bifunktional	LNL	275,2845
Dehydrolysinonorleucin	bifunktional	$\Delta$ -LNL	273,1689
Desmosin	tetra­funktional	DES	526,2871
Isodesmosin	tetra­funktional	IDES	526,2871

**Allgemeine Hinweise**

Sofern nicht anders beschrieben handelt es sich in der vorliegenden Arbeit bei der genannten Masse von Molekülen  $\leq 10.000$  Da immer um die monoisotopische Masse. Kanonische Aminosäuresequenzen von Peptiden sind jeweils im Einbuchstabencode im Fließtext und Abbildungen dargestellt. Posttranslational modifizierte Aminosäuren sind zur besseren Erkennbarkeit im Fließtext und in Tabellen im Dreibuchstabencode abgebildet. Quervernetzte Aminosäuren sind im Fließtext und in Tabellen unterstrichen, dadurch verbundene Peptide sind ebenfalls durch einen Grundstrich verbunden. In Fachartikeln bezüglich Elastins werden die von den jeweiligen Exons kodierten Sequenzen auf Proteinebene entsprechend als Domäne bezeichnet. Diese Definition wurde für diese Arbeit übernommen. Das ist nicht mit der sonst üblichen Definition einer Proteindomäne zu verwechseln, die sie als komplexe gefaltete Untereinheit eines Proteins definiert. Ist ein Peptid eindeutig einer Position innerhalb von Tropoelastin zuzuordnen, so wird die N-terminale Aminosäure in der jeweiligen Position innerhalb der Sequenz durch eine hochgestellte Zahl kenntlich gemacht.

**Abbildungsverzeichnis**

<b>Abb. 1:</b> Übersicht der Komponenten des losen Bindegewebes .....	2
<b>Abb. 2:</b> Entstehung einer elastischen Faser .....	5
<b>Abb. 3:</b> Domänenstruktur von humanem TE IF 2 .....	7
<b>Abb. 4:</b> Generierung der Quervernetzungsaminosäuren in Elastin .....	9
<b>Abb. 5:</b> Oberflächenstrukturen und Polymerisierung von humanem TE .....	12
<b>Abb. 6:</b> Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers .....	14
<b>Abb. 7:</b> Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF Massenspektrometers .....	15
<b>Abb. 8:</b> Aufbau des Quadrupol-Massenanalysators .....	19
<b>Abb. 9:</b> Aufbau des Orbitrap-Massenanalysators .....	20
<b>Abb. 10:</b> Schematischer Aufbau der nanoESI-Hybridinstrumente Orbitrap Velos Pro MS und Orbitrap Fusion Tribrid MS .....	21
<b>Abb. 11:</b> Fragmentierungsschema am Beispiel eines linearen Tripeptides .....	25
<b>Abb. 12:</b> In proteolytischen Elastinverdauen vorkommende Peptidkomponenten und deren Nomenklatur .....	30
<b>Abb. 13:</b> Strukturformeln der derivatisierten DES-Standards .....	39
<b>Abb. 14:</b> LTQ-Orbitrap Velos Pro-Methode zur Detektion von DES/IDES-enthaltenen Peptiden .....	46
<b>Abb. 15:</b> Spaltspezifität von PE und <i>Nepenthes</i> -Extrakt gegenüber rekombinant hergestelltem humanem TE IF 2 .....	53
<b>Abb. 16:</b> Moleküldynamiksimulationen der bifunktional quervernetzten Peptide aus ANAO-TE .....	57
<b>Abb. 17:</b> CID-Spektrum von LNL bei 20 eV aufgenommen mittels nanoESI-QqTOF MS ...	59
<b>Abb. 18:</b> CID-Spektrum von DES und IDES bei 40 eV aufgenommen mittels nanoESI-QqTOF MS .....	60
<b>Abb. 19:</b> Abhängigkeit der Fragmentierung von DES und IDES durch CID von der Kollisionsenergie .....	61
<b>Abb. 20:</b> CID-Pseudo-MS <sup>3</sup> -Spektrum von <i>m/z</i> 262 freigesetzt aus DES aufgenommen mittels nanoESI-QqTOF MS .....	62
<b>Abb. 21:</b> DESGET-Scores zur Unterscheidung von linearen und tetrafunktional quervernetzten Peptiden .....	66

<b>Abb. 22:</b> Abundanz des C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sup>+</sup> -Fragmentions in proteolytischen Verdauen von TE und Elastin isoliert aus <i>HSA</i> , <i>BTA</i> und <i>XTR</i> aufgenommen an dem nanoHPLC-nanoESI-LTQ-Orbitrap Velos Pro MS.....	69
<b>Abb. 23:</b> Retentionsverhalten von tetrafunktional quervernetzten Peptiden aus humanem Aortenelastin akquiriert am nanoHPLC-nanoESI-LTQ-Orbitrap Velos Pro MS .....	70
<b>Abb. 24:</b> Spaltstellenanalyse von bovinem Aortenelastin (IF 1) nach proteolytischem Verdau mit PE.....	72
<b>Abb. 25:</b> CID-Spektren von einem intra- (GVKPGKVP (LNL)) und einem interpeptidal (AGKAGYPT_AKLGAGGA (AA)) quervernetzten Peptid aus bovinem Aortenelastin .....	74
<b>Abb. 26:</b> HCD-Spektrum des tetrafunktional quervernetzten Peptides KAAAKLGAGGA_AAAAK_KAA aus bovinem Elastin .....	76
<b>Abb. 27:</b> Molekulares Docking des tetrafunktional quervernetztes Peptides AKAAKFGAA_AAKAAAKAAA mit dem katalytischen Zentrum S214 von PE.....	78
<b>Abb. 28:</b> Identifizierte quervernetzte und nicht quervernetzte Lysinreste in bovinem Elastin	80
<b>Abb. 29:</b> Spaltstellenanalyse von humanem Aortenelastin (IF3), verdaut mit der Protease PE .....	82
<b>Abb. 30:</b> CID-Spektrum des linearen Peptides GVKP-Lya-APGVGGA aus humanem Aortenelastin .....	83
<b>Abb. 31:</b> CID-Spektren der zwei durch LNL intrapeptidal quervernetzten Peptide GVKPKAPGVGGA und GALPGGKPLKVPVG aus humanem Aortenelastin .....	85
<b>Abb. 32:</b> CID-Spektrum des durch LNL bifunktional interpeptidal quervernetzten Peptides TTGKLPY_AAK aus humanem Aortenelastin .....	86
<b>Abb. 33:</b> HCD-Spektren und Strukturformel des tetrafunktional quervernetzten KAAKYGA_AAKAAAKAA Peptides aus humanem Aortenelastin .....	87
<b>Abb. 34:</b> Identifizierte quervernetzte und nicht quervernetzte Lysinreste in humanem Elastin .....	89
<b>Abb. 35:</b> Spaltstellenanalyse von Lungenelastin aus <i>XTR</i> , verdaut mit der Protease PE.....	93
<b>Abb. 36:</b> CID-Spektren bei 35 % NE des Peptides GKPP-Aad-PGLG identifiziert in Elastin von <i>XTR</i> sowie des synthetisierten Peptides GKPP-Aad-PGLG .....	95
<b>Abb. 37:</b> CID-Spektrum des durch Δ-LNL bifunktional intrapeptidal quervernetzten Peptides GTYPGGKPPKPG aus Lungenelastin von <i>XTR</i> .....	97
<b>Abb. 38:</b> CID-Spektren der intrapeptidal quervernetzten Peptide GGLYPGAGGKPPKPG (LNL) und GGLYPGAGGKPPKPG (AA) aus Lungenelastin von <i>XTR</i> .....	98
<b>Abb. 39:</b> Identifizierte quervernetzte und nicht quervernetzte Lysinreste in Elastin aus <i>XTR</i> .....	100

**Abb. 40:** Modifiziertes *head-to-tail*-Modell von Elastin am Beispiel von zwei TE-Monomeren ..... 123

**Abbildungsverzeichnis Anhang**

**Abb. A. 1:** Sequenzalignierung der kanonischen TE-Sequenzen aus *HSA*, *BTA* und *XTR* (TE1) .....LIII

**Abb. A. 2:** Aminosäuresequenz von TE2 aus *XTR*.....LIII

**Abb. A. 3:** Modifizierte Aminosäuresequenzen von humanem, bovinem und Froschelastin zur Identifizierung intrapeptidaler Quervernetzungen mittels PEAKS.....LV

**Abb. A. 4:** Sequenzabdeckung von humanem TE IF 2 proteolytisch verdaut mit PE ..... LVII

**Abb. A. 5:** Sequenzabdeckung von humanem TE IF 2 proteolytisch verdaut mit *Nepenthes*-Extrakt ..... LVII

**Abb. A. 6:** Zeitabhängige Degradation von TE und Elastin, gewonnen aus Mauseorta, durch *Nepenthes*-Extrakt ..... LVIII

**Abb. A. 7:** Zeitabhängige Degradation von TE durch *Nepenthes*-Extrakt ..... LIX

**Abb. A. 8:** Spaltstellenanalyse von humanem Aortenelastin, verdaut mit den Proteasen PE, Chymotrypsin (CTR) und Trypsin (TR) ..... LX

**Abb. A. 9:** Spaltstellenanalyse von ANAO-TE, verdaut mit den Proteasen PE, Chymotrypsin (CTR) und Trypsin (TR) ..... LXI

**Abb. A. 10:** Verteilung der Abstände zwischen Cε- und Cδ-Atomen der Lysin- oder Allysinseitenketten innerhalb der 100 ns Moleküldynamiksimulation ..... LXII

**Abb. A. 11:** Kollisionsenergieabhängige Fragmentierung von LNL durch CID mittels ESI-QqTOF MS ..... LXIII

**Abb. A. 12:** CID-Pseudo-MS<sup>3</sup>-Fragmentierungsschema des DES/IDES-Fragmentions bei *m/z* 262 ..... LXIII

**Abb. A. 13:** CID-Spektren von DES/IDES, deren Derivaten, DES/IDES-enthaltenden Peptiden und linearen Peptiden bei erhöhten Kollisionsenergien ..... LXIV

**Abb. A. 14:** CID-Spektrum von Ac-AAAKKAAAKKAA\_Ac-AAAKKAAAKAA\_Ac-AAAKKAAAKAA bei einer Kollisionsenergie von 35 eV im *m/z*-Bereich 50-500 ..... LXV

**Abb. A. 15:** RMSD-Analyse des stabilen Peptid-PE-Komplexes innerhalb der 20 ns MD-Simulation ..... LXIX

**Abb. A. 16:** CID-Spektrum des linearen Peptides VVPQPGAGV-Aad-PG aus humanem Aortenelastin ..... LXX

<b>Abb. A. 17:</b> CID-Spektrum des linearen Peptides LGPGVKPA aus bovinem Aortenelastin .....	LXXXIII
<b>Abb. A. 18:</b> Falsch identifiziertes Peptid GKP-Hyp-Lya-PGVGGA aus Elastin von <i>XTR</i> .....	LXXXIV
<b>Abb. A. 19:</b> Korrekt identifiziertes Peptid GKPP-Aad-PGVGGA aus Elastin von <i>XTR</i> .....	LXXXV
<b>Abb. A. 20:</b> CID-Spektren bei 35 % NE des Peptides GAKPP-Aad-IG identifiziert in Elastin von <i>XTR</i> sowie des synthetisierten Peptides GAKPP-Aad-IG.....	LXXXVI
<b>Abb. A. 21:</b> CID-Spektren der linearen Peptide G-Lya-PPKPGVGGA und G-Aad-PPKPGVGGA aus Lungenelastin von <i>XTR</i> .....	LXXXVII
<b>Abb. A. 22:</b> CID-Spektren der linearen Peptide GKPP-Lya-PGVGGA und GKPP-Aad-PGVGGA aus Lungenelastin von <i>XTR</i> .....	LXXXVIII
<b>Abb. A. 23:</b> CID-Spektrum des durch AA intrapeptidal quervernetzten Peptides GKAGKAGYPT aus Lungenelastin von <i>XTR</i> .....	LXXXIV
<b>Abb. A. 24:</b> CID-Spektrum des durch AA intrapeptidal quervernetzten Peptides GNGVKEKAPGGGA aus Lungenelastin von <i>XTR</i> .....	LXXXIV
<b>Abb. A. 25:</b> CID-Spektrum des durch AA interpeptidal quervernetzten Peptides GGKPPKPG_AAKAA aus Lungenelastin von <i>XTR</i> .....	LXXXV
<b>Abb. A. 26:</b> Vorläufer- und Fragmentationenspektren von totalhydrolysiertem und nachfolgend propionyliertem Elastin aus <i>XTR</i> in Vergleich mit dem Fragmentationenspektrum eines propionylierten DES-Standards mittels MALDI-TOF/TOF MS .....	LXXXV
<b>Abb. A. 27:</b> Dissoziationsmechanismus des Neutralverlustes von CO und NH <sub>3</sub> aus den Alkylketten von DES/IDES im Zuge der Fragmentation durch CID.....	LXXXVI
<b>Abb. A. 28:</b> Falsch identifiziertes Peptid PPPAKPGVGGA aus Elastin von <i>XTR</i> ....	LXXXVII

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Lineare und quervernetzte Peptide identifiziert in ANAO-TE, die mittels MD-Simulationen untersucht wurden .....	50
<b>Tab. 2:</b> Elementare Zusammensetzung der bei 100 eV mittels ESI-LTQ-Orbitrap Velos Pro MS beobachteten HCD-Fragmentionen von DES/IDES .....	63

## Tabellenverzeichnis Anhang

<b>Tab. A. 1:</b> Aminosäurezusammensetzung der kanonischen TE IF aus den drei Organismen <i>HSA</i> (IF 3), <i>BTA</i> (IF 1) und <i>XTR</i> (TE1) .....	LIV
<b>Tab. A. 2:</b> In PEAKS als variable PTMs implementierte Massendifferenzen abhängig von dem Quer-vernetzungstyp und dem Quervernetzungsmotiv .....	LVI
<b>Tab. A. 3:</b> Aminosäureaustausche in Elastin von <i>BTA</i> verglichen mit IF 1 .....	LXVI
<b>Tab. A. 4:</b> Intrapeptidal bifunktional quervernetzte Peptide aus <i>BTA</i> .....	LXVII
<b>Tab. A. 5:</b> Interpeptidal bifunktional quervernetzte Peptide aus <i>BTA</i> .....	LXVIII
<b>Tab. A. 6:</b> Interpeptidal tetrafunktional quervernetzte Peptide aus <i>BTA</i> .....	LXIX
<b>Tab. A. 7:</b> Intrapeptidal bifunktional quervernetzte Peptide aus <i>HSA</i> .....	LXXI
<b>Tab. A. 8:</b> Interpeptidal bifunktional quervernetzte Peptide aus <i>HSA</i> .....	LXXII
<b>Tab. A. 9:</b> Lineare Peptide mit posttranslational modifizierten Lysinresten aus <i>XTR</i> ....	LXXIX
<b>Tab. A. 10:</b> Intrapeptidal bifunktional quervernetzte Peptide aus <i>XTR</i> .....	LXXXII



## Zusammenfassung

Bei Elastin handelt es sich um ein Strukturprotein der extrazellulären Matrix, das in allen Wirbeltieren mit Ausnahme der Rundmäuler vorkommt und dazu dient, unterschiedlichsten Geweben Elastizität und Spannkraft zu verleihen. Strukturell handelt es sich um ein wasser- und fettunlösliches Biopolymer. Gebildet wird es beim Menschen nur in den ersten Lebensjahren aus dem löslichen Vorläuferprotein Tropoelastin (TE), dessen Lysinreste posttranslational oxidativ desaminiert werden und dadurch anschließend spontan kovalente Bindungen mit ebenfalls modifizierten Lysinresten anderer TE-Moleküle ausbilden. Hierbei entstehen unterschiedlichste bi-, tri- und sogar tetrafunktionale Aminosäuren wie z.B. Desmosin (DES) und Isodesmosin (IDES), die einzigartig für Elastin sind. Das Resultat ist reifes Elastin, das, einmal gebildet, eine Halbwertszeit von 70 Jahren besitzt und unter gesunden Umständen keinen signifikanten Umwandlungen oder Abbau unterliegt.

Über die genaue Anordnung dieser Quervernetzungen ist so gut wie nichts bekannt. Damit einhergehend ist auch unklar, welche Domänen miteinander quervernetzt sind. Da Elastin aufgrund seines polymerartigen Aufbaus gängigen Methoden zur Strukturaufklärung wie z.B. NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallographie nicht zugänglich ist, stellt die Massenspektrometrie (MS) eine vielversprechende Alternative dar. Die strukturelle MS gewinnt mit wachsender Leistungsfähigkeit der Geräte seit einigen Jahren immer mehr an Bedeutung. Mittels Techniken wie Wasserstoff/Deuterium-Austausch, kovalenter Markierung lösungsmittel-exponierter Aminosäuren und künstlich eingefügten Quervernetzungen können Proteinstrukturen und Interaktionsflächen von Proteinkomplexen charakterisiert werden. Somit war das Ziel dieser Arbeit die erstmalige Identifizierung von intrinsisch quervernetzten Elastinpeptiden in einem „*bottom-up*“-Ansatz. Eine Hürde bei Elastin ist hierbei, dass es nicht mittels spezifisch schneidender Proteasen hydrolytisch spaltbar ist, da entsprechende Aminosäuren in der Sequenz fehlen. Einzig unspezifisch schneidende Proteasen, wie z.B. Elastasen, sind dazu in der Lage, Elastin in wasserlösliche Peptide zu spalten und damit analysierbar zu machen. Dieser Umstand und die repetitive Bereiche enthaltende Aminosäuresequenz von TE erschweren die anschließende Sequenzierung erheblich, weswegen zunächst Methoden erarbeitet wurden, um die Identifizierung von quervernetzten Elastinpeptiden in einem komplexen Verdau soweit wie möglich zu vereinfachen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die relative Spaltspezifität von Pankreaselastase (PE) mit TE als Substrat bestimmt. Daraus wurde abgeleitet, welche Motive bevorzugt innerhalb der Quervernetzungsdomänen von reifem Elastin gespalten werden. Die

Existenz von Elastasen war bislang nur in Bakterien und Wirbeltieren nachgewiesen worden. Vergleichende massenspektrometrische Analysen mit einem Protease-Extrakt, isoliert aus der karnivoren Kannenpflanze der Gattung *Nepenthes*, ergaben, dass dieser ebenfalls dazu in der Lage ist, Elastin innerhalb von 24 h vollständig abzubauen. Nichtsdestotrotz spaltete das Proteasegemisch nicht spezifischer als PE, weswegen PE für weitere Untersuchungen zum Abbau von Elastin gewählt wurde. Moleküldynamiksimulationen von quervernetzten Peptiden aus *in vitro* quervernetztem TE zeigten, auf welche Weise sich diese Quervernetzungen ausbilden können und wie die eingefügte Quervernetzung die Struktur stabilisieren kann. Diese Erkenntnisse konnten anschließend angewendet werden, um die strukturelle Organisation von nativem Elastin auf molekularer Ebene besser zu verstehen.

Um die massenspektrometrische Identifizierung von polyfunktional quervernetzten Peptiden in intaktem Elastin schon auf instrumenteller Ebene zu vereinfachen, wurde eine Möglichkeit gesucht, quervernetzte Peptide spezifisch detektieren zu können. Es zeigte sich, dass die bifunktionale Aminosäure Lysinonorleucin (LNL) in Elastin bei der kollisionsinduzierten Dissoziation (CID) keine spezifischen Fragmentationen freigibt, wohingegen DES und IDES bei erhöhter Kollisionsenergie im Zuge von CID ammoniumionenähnliche spezifische Ionen bilden, die eine eindeutige Aussage darüber zulassen, ob das entsprechende Peptid DES/IDES enthält oder nicht. Mithilfe dieser MS-Methode war es möglich, in proteolytischen Verdauen von reifem Elastin desmosinenthaltende Peptide zu identifizieren. Im Gegensatz zu linearen Peptiden eluieren DES/IDES-Peptide auch schon zu sehr geringen Retentionszeiten, wodurch es möglich wurde, diese durch Fraktionierung anzureichern. Um ein möglichst umfassendes Bild über die strukturelle Anordnung von Elastin zu gewinnen, wurde neben isoliertem humanem und bovinem Elastin auch Elastin des tropischen Krallenfrosches, dessen Aminosäuresequenz sich grundlegend von der aus Säugetieren unterscheidet, als Forschungsgegenstand verwendet.

Proteolytisch gespaltene Elastinproben wurden basierend auf der entwickelten Methode mit und ohne Vorfraktionierung mittels Umkehrphasenchromatographie-gekoppelter MS gemessen. Die anschließende Analyse erfolgte durch eine Kombination aus algorithmengestützter Auswertung zur Identifizierung von quervernetzten Peptiden sowie manueller *de novo*-Sequenzierung. Dieser Ansatz erlaubte die erstmalige Sequenzierung von quervernetzten Peptiden aus Elastin mit Hilfe von MS.

Neben einer Vielzahl von bifunktional quervernetzten Peptiden konnten bei humanem und bovinem Elastin eindeutig Peptide sequenziert werden, die durch DES/IDES miteinander

quervernetzt waren. Dabei waren entweder zwei oder drei Peptide darüber vernetzt und es waren ausschließlich Domänen involviert, in denen die meist paarweise angeordneten Lysine durch Alanine voneinander getrennt waren. Molekulare Dockingsimulationen legten nahe, dass es sich bei den drei miteinander vernetzten Peptiden ursprünglich um zwei gehandelt haben könnte und das dritte Peptid durch die proteolytische Spaltung durch PE erzeugt wurde. Es wurden keine DES/IDES-enthaltenen Peptide beim Frosch sequenziert. Bei dem Elastin von allen drei untersuchten Arten wurde festgestellt, dass sich die größtenteils paarweise angeordneten Lysine oftmals über die bifunktionalen Aminosäuren Allylsinaldol oder auch LNL und Dehydrolysinonorleucin miteinander verknüpften, jedoch oft nicht zu DES/IDES weiterkondensierten. Dieses Ergebnis war sehr unerwartet, da bislang angenommen wurde, dass solche intrapeptidal quervernetzten Peptide immer zu DES/IDES-Peptiden kondensieren, da intrapeptidal quervernetzte Peptide bislang nicht identifiziert worden waren. Darüber hinaus wurde der Großteil der Lysine sowohl linear, intrapeptidal als auch interpeptidal quervernetzt identifiziert. Insbesondere bei Elastin aus Froschgewebe wurden Lysinreste oftmals zu Allysin oder  $\alpha$ -Amino adipinsäure modifiziert, entdeckt. Dieses deutet dort auf einen geringeren Grad der Quervernetzung hin. Insgesamt zeigte sich bei allen untersuchten Geweben und Organismen, dass Elastin nicht so homogen quervernetzt ist, wie bisher angenommen: Gleiche Lysinreste im gleichen Gewebe können unterschiedliche Quervernetzungen mit unterschiedlichen Domänen eingehen. Basierend auf den gewonnenen Daten wurde ein bestehendes Modell zur Elastogenese weiterentwickelt. Dies besagt nun, dass TE-Monomere zunächst leicht überlappend miteinander quervernetzt werden. Im Laufe der Zeit bilden sich in der elastischen Faser dann weitere unspezifische Quervernetzungen aus. Das Resultat ist ein äußerst heterogen quervernetztes Biopolymer.

Die gewonnenen Kenntnisse liefern nun nicht nur ein umfassendes Bild über die strukturelle Anordnung der TE-Monomere und deren Vernetzung bei Wirbeltieren, sondern helfen auch die Ursache der Elastizität besser zu verstehen. Bislang konnte bereits gezeigt werden, dass ungeordnete Strukturen elastische Eigenschaften fördern. Der in dieser Arbeit gezeigte heterogene Aufbau Elastins, induziert durch das komplexe Quervernetzungsmuster, ist in dem entropiegetriebenen Prozess, der der Elastizität zugrunde liegt, höchstwahrscheinlich einer der Hauptgründe dafür, dass Elastin überhaupt elastisch ist.

# 1 Theoretischer Hintergrund

## 1.1 Biologischer Hintergrund

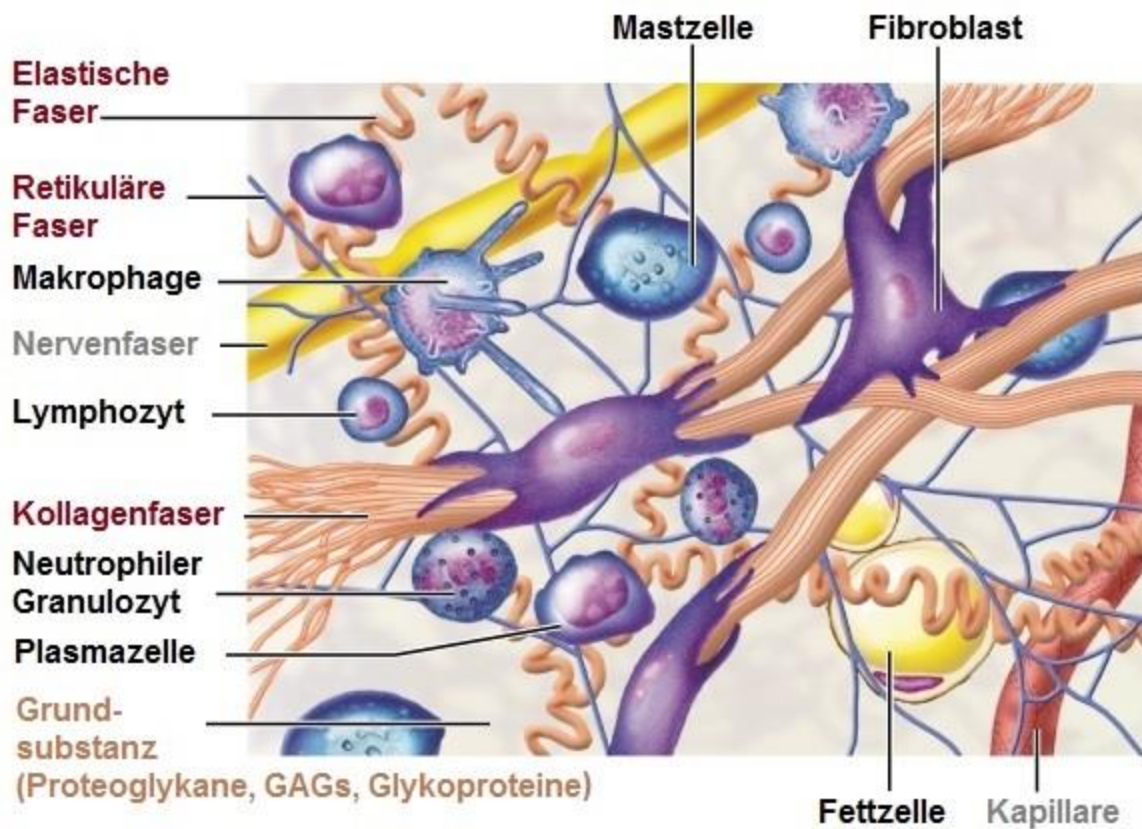
Proteine zählen in allen Organismen zu den elementaren Bausteinen. Dabei erfüllen sie vielfältige Aufgaben. Diese reichen von der Katalyse chemischer Reaktionen, der Signalperzeption, dem Stofftransport bis hin zur Formgebung verschiedener Gewebetypen. Unterschiedliche tierische Gewebetypen bestehen aus Zellverbänden sowie aus der dazwischenliegenden extrazellulären Matrix (EZM). Durch die Zellmembran grenzen sich die Zellen strukturell von der EZM ab (1). Ein fester Halt des Gewebes und dauerhafte mechanische Stabilität sind dabei unerlässlich, um Stoffwechselprozesse kontrolliert ablaufen zu lassen. Auf Zellebene wird die Strukturgebung bei Eukaryonten durch ein Zytoskelett bestehend aus Aktin, Mikrotubuli sowie Intermediärfilamenten gewährleistet (2). Zentrale Strukturproteine sind dort Tubulin, Aktin, Myosin, Keratin, Vinculin, Vimentin und Desmin. Diese erfüllen dabei unterschiedliche Zwecke als Teil des Zytoskeletts und dienen nicht nur der mechanischen Stabilisierung und Formveränderungen der Zelle, sondern auch der Signalvermittlung, motorischen Abläufen und Zell-Zell-Interaktionen (3). Zusätzlich nehmen die EZM und die darin enthaltenen zentralen Strukturproteine Kollagen und Elastin eine zentrale Rolle bei der Formgebung und der Homöostase diverser Gewebetypen ein. In dem folgenden Kapitel sollen die EZM sowie Elastin als Thema der vorliegenden Arbeit charakterisiert werden.

### 1.1.1 Die extrazelluläre Matrix als multifunktionales Gewebegerüst bei Wirbeltieren

Die EZM stellt den Teil des tierischen Gewebes dar, der sich zwischen den Zellen befindet (4). Er wird auch als Interzellulärsubstanz bezeichnet. Im Bindegewebe nimmt die EZM ein deutlich größeres Volumen ein als die Zellen, die sie umgibt. Aufgrund dessen sind die physikalischen Eigenschaften unterschiedlicher Gewebetypen überwiegend von den Komponenten der EZM abhängig (5). Dachte man früher, dass die EZM hauptsächlich als Verbindungssubstanz dient, um die Zellverbände zusammenzuhalten, so haben Studien der letzten 20 Jahre ergeben, dass die EZM ein dynamisches Netzwerk ist, dessen Funktion weit über formgebende Eigenschaften hinausgeht (6). Dabei spielen die Komponenten der EZM eine wichtige Rolle hinsichtlich der Signalvermittlung (7), der Zellhomöostase, der Gewebemorphogenese, dem Wasserhaushalt, bei Wundheilungsprozessen sowie der Elastizität verschiedener Gewebetypen (8). Darüber hinaus dient die EZM als Reservoir für Zytokine, die beide

zusammen als eine Art Informationsnetzwerk Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose steuern (9). Die Bedeutung der EZM hinsichtlich dieser Prozesse wird insbesondere darin deutlich, dass sich Dysfunktionen von Proteinen der EZM durch genetische Defekte in sehr vielfältigen Krankheitsbildern niederschlagen können (10).

Obwohl die EZM prinzipiell immer aus Wasser, Proteinen und Polysacchariden aufgebaut ist, ist die genaue Zusammensetzung von den Anforderungen des jeweiligen Gewebetyps abhängig. Dabei lassen sich strukturell Grundsubstanz und Fasern unterscheiden. Die genaue Zusammensetzung wird im reziproken Austausch mit dem wachsenden Zellnetzwerk durch sogenannte Matrixmetalloproteasen (MMPs) dynamisch reguliert (11). Abb. 1 zeigt beispielhaft die Organisation des losen Bindegewebes mit verschiedenen Zelltypen sowie der dazwischenliegenden EZM.



**Abb. 1: Übersicht der Komponenten des losen Bindegewebes**

Unterschiedliche Zelltypen sowie die einzelnen Bestandteile der EZM sind entsprechend gekennzeichnet: Faserige Bestandteile der EZM sind dunkelrot, die Grundsubstanz ist beige beschriftet. Zelltypen sind schwarz markiert und sonstige Bestandteile grau beschriftet. Modifiziert nach Marieb (12).

Die Grundsubstanz stellt den Teil der EZM dar, in den die Fasern eingebettet sind. Es handelt sich hierbei hauptsächlich um in Wasser gelöste Aminosäuren, Proteoglykane und

Glykosaminoglykane (GAGs). Bei GAGs handelt es sich um lineare, sulfatierte, negativ geladene Polysaccharide mit einem Molekulargewicht (MW) zwischen 10 kDa und 100 kDa. Zu diesen zählen Heparan-, Keratan- und Chondroitinsulfat sowie Hyaluronsäure (13). GAGs sind in wässriger Lösung von einer Hydrathülle umgeben, weswegen sie ein großes hydrodynamisches Volumen einnehmen können. Mit Ausnahme von Hyaluronsäure bilden GAGs durch Bindung an Proteine die Klasse der Proteoglykane. Proteoglykane wie z.B. Decorin und Perlecan regulieren vielfältige Prozesse wie die Morphogenese und Signaltransduktion innerhalb der EZM (14). Die Hauptfunktion der Proteoglykane bleibt aufgrund der hohen Wasserbindekapazität der GAGs jedoch das Bilden eines Wasserreservoirs. Dieses dient dazu, mechanischen Belastungen standzuhalten und Stoffwechselprozesse stattfinden zu lassen (15). Zu diesen strukturbildenden Proteoglykanen zählen u.a. Aggrecan (16), Versican (17) und im Gehirn Neurocan (18).

Über Adhäsionsproteine, die an Zellrezeptoren binden, findet in so gut wie jedem Gewebe sowohl ein Signalaustausch zwischen der Zelle und der EZM als auch die Verankerung beider statt (19). Integrine, die sich in Alpha- und Beta-Untereinheiten gliedern lassen, stellen dabei die wichtigste Proteinklasse zum Informationsaustausch dar (20,21). Über ein spezifisches Erkennungsmotiv (Arginin-Glycin-Aspartat, RGD-Motiv) kann eine Vielzahl von Glykoproteinen an diese binden und eine Zellantwort wie Zellmigration vermitteln (22,23). Zu den wichtigsten Bindungspartnern zählen Kollagene, Cadherin, Fibronectin, Laminin, Vitronectin, Plasminogen und Invasin (24).

In die Grundsubstanz sind die faserigen Bestandteile der EZM eingegliedert. Diese setzen sich aus elastischen Fasern und kollagenen Fasern zusammen (vgl. Abb. 1). Die Familie der humanen Kollagene umfasst derzeit 28 bekannte Proteine (I bis XXVIII) (25). Bei Kollagen handelt es sich um das mengenmäßig abundanteste Protein im menschlichen Körper. Es macht ungefähr ein Drittel der gesamten Proteinmasse aus und dient dazu, bestimmten Gewebetypen, wie der Haut oder dem Knorpel, Zugfestigkeit zu verleihen (26). Dies wird durch das für Kollagen einzigartige, überwiegend vorhandene Strukturmotiv gewährleistet: Es handelt sich um drei lineare Polypeptidstränge in einer linksgängigen, polyprolin-II-typartigen helikalen Konformation, die sich umeinander wickeln und dadurch eine rechtsgängige Tripelhelix aufbauen (27). Diese bilden anschließend Fibrillen aus und ordnen sich anschließend wiederum untereinander zu fibrillären Fasern mit einem Durchmesser von 1  $\mu\text{m}$  - 20  $\mu\text{m}$  an (28). Die dichte Packung der Tripelhelix erfordert, dass jede dritte Aminosäure ein Glycin ist. Meist handelt es sich um ein sich wiederholendes PPG-Motiv, wobei das Prolin an Position 2

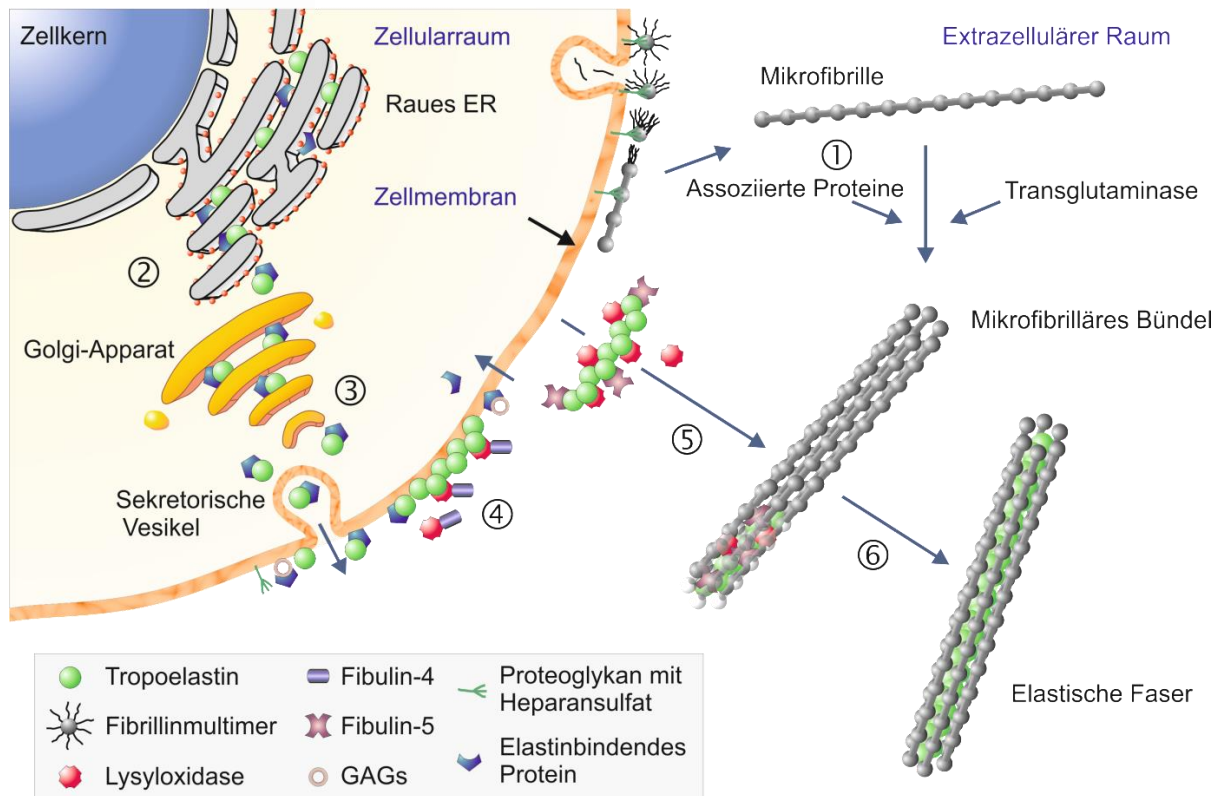
hydroxyliert wird. Prolinreste innerhalb dieses Motives in Kollagen sind nahezu ausschließlich am Kohlenstoff an Position 4 hydroxyliert (29,30). Es konnte gezeigt werden, dass die eingefügte polare Hydroxyfunktion die tripelhelikale Struktur stabilisiert (31). Zur weiteren Stabilisierung sind Kollagenstränge teilweise über kovalent verknüpfte Lysinseitenketten und Hydroxylysinseitenketten miteinander quervernetzt (32). Dünne Bündel von Kollagen Typ III bilden die retikulären Fasern (vgl. Abb. 1). Die elastischen Fasern setzen sich hauptsächlich aus Elastin und Fibrillin zusammen und werden im folgenden Kapitel diskutiert.

### 1.1.2 Elastische Fasern – Struktur und Funktion

Elastische Fasern (Durchmesser meist ca. 2  $\mu\text{m}$ ) sind ein zentraler Bestandteil der EZM bei allen Kiefernäulern (*Gnathostomata*) und dienen dazu, mechanisch beanspruchten Gewebetypen Elastizität und Spannkraft zu verleihen, wodurch diese reversibel gedehnt werden können. Zu diesen Geweben zählen größere Blutgefäße, die Lunge, Knorpel, Stimmbänder, Sehnen sowie die Haut. Abhängig davon, wie hoch die mechanische Belastung ist, variiert der Gehalt der Fasern innerhalb des Gewebes. So beträgt der Gehalt in der Aorta bis zu 60 % der Trockenmasse, während die Haut nur zu ca. 2 % - 3 % elastische Fasern enthält. Darüber hinaus ist die strukturelle Organisation der Fasern vom jeweiligen Gewebetyp abhängig und den spezifischen Funktionen angepasst. Innerhalb der Media-Schicht der Aorta formen sie konzentrische lamellare Strukturen, während sie sich in der Lunge als stark verzweigte Verästelungen durch die Alveolen ziehen (33).

Elastische Fasern bestehen aus einem festen Kern aus dem amorphen Biopolymer Elastin, der von Mikrofibrillen umgeben ist. Elastin wird lediglich in den ersten Lebensjahren in den Fibroblasten und anderen elastogenen Zellen wie weichen Muskelzellen, Chondrozyten, Keratinozyten und Endothelzellen hergestellt (34). Elastische Fasern erhalten - einmal synthetisiert - ihre elastische Funktion das ganze Leben lang aufrecht (35). Die Halbwertszeit elastischer Fasern beträgt beim Menschen mehr als 70 Jahre (36). Eine schematische Übersicht der Synthese einer elastischen Faser ist in Abb. 2 gezeigt. Zur Elastogenese wird das lösliche Vorläuferprotein von Elastin, Tropoelastin (TE), aus elastogenen Zellen mithilfe des elastinbindenden Proteins (EBP) sezerniert und auf einem mikrofibrillären Bündel deponiert (37). Fibulin-4 und Fibulin-5 vermitteln dann eine dichte Anordnung der TE-Moleküle untereinander (38). Durch die vorherige oxidative Desaminierung von TE-Lysinseitenketten mittels der  $\text{Cu}^{2+}$ -abhängigen Lysyloxidase (LOX) und LOX-ähnlichen Proteinen (LOXL), werden reaktive Allylsine erzeugt, die anschließend durch die vorhandene Aldehydgruppe spontan mit ande-

ren Allylsinen und Lysinen kovalente Bindungen bilden können (39,40). Dadurch kommt es zu einer starken Vernetzung der unterschiedlichen TE-Moleküle untereinander. Der Elastinkern einer elastischen Faser macht ca. 90 % der Masse aus. Mikrofibrillen sind jeweils ca. 10 nm - 12 nm dick und umspannen eine elastische Faser longitudinal als unverzweigte Proteinstränge (41). Im Gegensatz zu Elastin sind diese nicht nur bei höheren Wirbeltieren zu finden, sondern in verschiedener Form bei allen Tieren (42).



**Abb. 2: Entstehung einer elastischen Faser**

[1] Fibrillin und mikrofibrillen-assoziierte Glykoproteine (MAGPs) werden von elastogenen Zellen in den extrazellulären Raum sezerniert und formen so Mikrofibrillen. [2] Nachdem TE durch das raue endoplasmatische Retikulum synthetisiert wurde, bindet es an das als Faltungshelfer agierende EBP. [3] Durch den Golgi-Apparat wird der TE-EBP-Komplex an die Zelloberfläche transportiert und anschließend in den extrazellulären Raum gegeben. [4] Durch Interaktion mit GAGs spaltet sich der TE-EBP-Komplex wieder auf. TE-Moleküle werden durch Fibulin-4 aneinander ausgerichtet. LOX und LOXL modifizieren vorhandene Lysinseitenketten und es bilden sich erste Quervernetzungen aus. [5] Nachdem das TE-Bündel eine kritische Größe erreicht hat, wird es durch Fibulin-5 in das mikrofibrilläre Bündel eingebracht. [6] Elastin aggregiert zu größeren Bündeln. Modifiziert nach Schmelzer (34).

Mikrofibrillen bestehen aus einem komplexen Netzwerk verschiedener Proteine. Hauptbestandteile sind Fibrillin-1 und Fibrillin-2. Bei Fibrillinen handelt es sich um rund 350 kDa große Glykoproteine, die in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  eine stäbchenartige Konformation einnehmen (43,44). Die Gene von Fibrillin-1 und Fibrillin-2 befinden sich auf den Chromosomen 15 und 5. Fibrillin-1-Mutationen verursachen das Marfan-Syndrom, das mit kardiovasku-



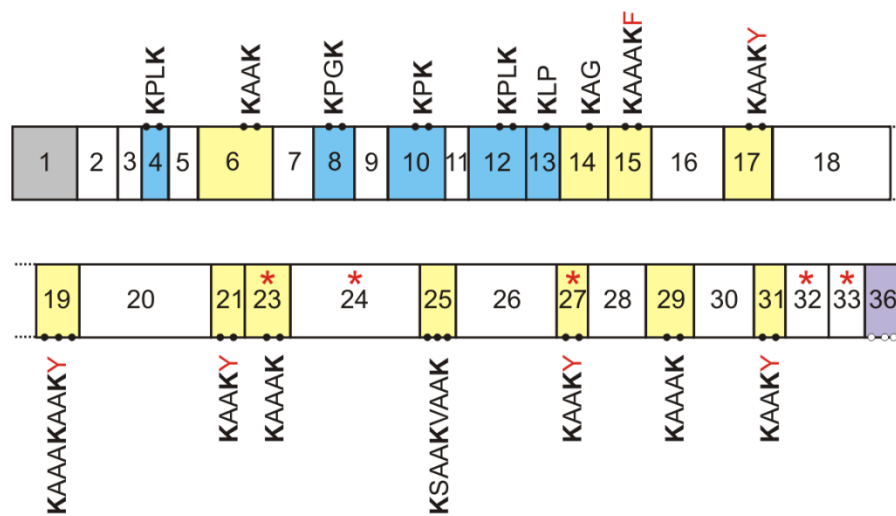
lären Defekten, Augenschäden und Schäden am Skelettsystem einhergeht (45). Für Fibrillin-3, dessen Gen auf Chromosom 19 liegt, wurde noch keine Interaktion mit Mikrofibrillen nachgewiesen (46). Weitere assoziierte Proteine sind das mikrofibrillen-assoziierte Glykoprotein 1 (MAGP-1), MAGP-2 sowie latente TGF $\beta$ -bindende Proteine (LTBPs) (47,48). Das rund 136 kDa große Glykoprotein Emilin, von dem bisher vier Mitglieder der Proteinfamilie bekannt sind, dient dazu, die Deposition von TE in die Mikrofibrillen zu regulieren (49). Mitglieder der Fibulin-Familie, von denen bisher acht bekannt sind, sind unter anderem im Elastinkern verankert und binden auch an der Schnittstelle zwischen dem Elastinkern und Fibrillin (50). Darüber hinaus existiert eine Vielzahl weiterer Glykoproteine und Proteoglykane, die mit Mikrofibrillen interagieren. Dabei ist jedoch unbekannt, ob es sich um essentielle Komponenten handelt und inwiefern sie die strukturelle Konformation beeinflussen.

Schäden an elastischen Fasern sind irreversibel und können durch eine Dysregulation körpereigener Proteasen induziert werden (51-53). Diese sind dazu in der Lage, Elastin proteolytisch zu spalten, was mit einer verminderten Elastizität der betroffenen Gewebetypen einhergeht. Weiterhin schlagen sich geschädigte elastische Fasern auch in diversen Krankheitsbildern wie Lungenemphysemen (54) und Aortenaneurysmen (55) nieder. Pathologisch freigesetzte Elastinpeptide können im Organismus als sogenannte Matrikine agieren (56). Dadurch wirken sie u.a. chemotaktisch auf umgebende Zellen und können das Tumorstadium von Melanomen beschleunigen (57,58). Die auch Elastokine genannten Peptide, die das Sequenzmotiv GxxPG enthalten, können u.a. von MMP-7, MMP-9 und MMP-12 freigesetzt werden (51).

### **1.1.3 Biochemische und physikalische Eigenschaften von Elastin**

Zu Beginn der Elastogenese beim Menschen wird Elastin als das lösliche Monomer TE aus elastogenen Zellen sezerniert. Nach Sekretion in den Interzellularraum wird das 26 Aminosäuren lange Signalpeptid, das 26 von 27 Aminosäuren der Domäne 1 ausmacht, abgespalten (vgl. Abb. 3). Das humane Elastin-Gen (*ELN*) gliedert sich in 34 Exons, die in ihrer Länge zwischen 30 bp und 225 bp variieren (59). Komparative Studien zwischen humaner und boviner cDNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure, engl. *complementary deoxyribonucleic acid*) haben gezeigt, dass beim humanen *ELN* Gen im Vergleich mit anderen Säugetieren die Exons 34 und 35 aufgrund eines sequentiellen Verlustes im Laufe der Primatenevolution nicht vorhanden sind (60), sodass das Exon am 3'-Ende als Exon 36 bezeichnet wird (61,62). Knochenfische besitzen aufgrund einer Genduplikation zwei Elastingene (63). Auch Frösche be-

sitzen zwei Elastingene, die beide in unterschiedlichen Geweben unterschiedlich stark exprimiert werden, wobei bis heute nicht genau verstanden ist, wovon das abhängt (64). Die kodierten Proteinsequenzen lassen sich bei Elastin aller Organismen in alternierende hydrophobe Domänen, die der Selbstaggregation dienen, und in etwas hydrophilere Quervernetzungsdomänen gliedern. Extensives alternatives Spleißen betrifft die Exons 22, 23, 24, 27, 32 und 33. Dabei sind sowohl hydrophobe als auch Quervernetzungsdomänen betroffen (vgl. Abb. 3). Durch die Kombination dieser Spleißvarianten ergibt sich eine Anzahl von bisher 13 entdeckten TE-Isoformen (IFs) beim Menschen, die in ihrem MW zwischen 60 kDa und 72 kDa variieren (59). Obwohl Exon 22 und 26A beide in der DNA vorhanden sind, sind deren Expressionslevel auf mRNA- und Proteinebene äußerst gering (61). IF 3 (UniProt-Code: P15502-3) wurde deshalb als kanonische Sequenz gewählt, da in dieser keine Exons ausgespleißt sind. IF 2 mit den ausgespleißten Domänen 22 und 26 A wird in der Natur jedoch deutlich häufiger beobachtet. Die exakte Funktion des alternativen Spleißens ist bis heute nicht verstanden, obwohl vermutet wird, dass dies gewebespezifisch und entwicklungsabhängig ist (65).



**Abb. 3: Domänenstruktur von humanem TE IF 2**

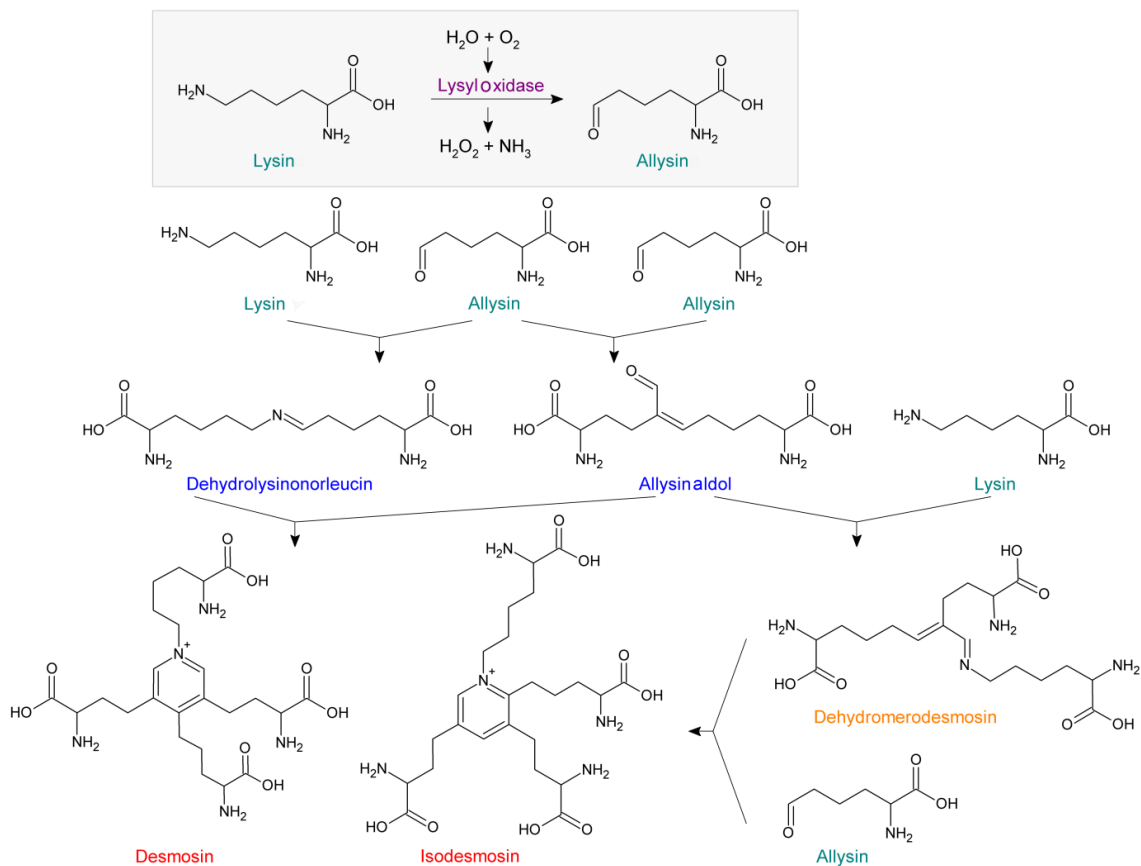
Domänen sind entsprechend des zugehörigen Exons nummeriert. Das Signalpeptid ist grau dargestellt. Hydrophobe Domänen sind weiß, Quervernetzungsdomänen sind blau und gelb markiert. Dabei gliedern sich diese in KP-Domänen (blau) und KA-Domänen (gelb). Die Quervernetzungsmotive sind ober- bzw. unterhalb der Domänenkarte im Einbuchstabencode dargestellt. Lysinreste, die potenziell kovalent quervernetzt werden können, sind fett markiert und darüber hinaus in der Abbildung als schwarz ausgefüllte Kreise dargestellt. Hydrophobe, sperrige Aminosäuren, die C-terminal zu Lysinresten liegen, sind rot markiert. Domänen, die alternativem Spleißen unterliegen, sind mit einem roten Sternchen gekennzeichnet. Die C-terminal liegende Domäne 36 ist violett gefärbt. Darin enthaltene Lysinreste sind als weiße Kreise markiert.

TE IF 2, das 724 Aminosäuren lang ist, ist insbesondere in den hydrophoben Domänen hoch repetitiv angeordnet. 79 % der Sequenz bestehen lediglich aus den vier Aminosäuren

Glycin (~ 30 %), Alanin (~ 23 %), Valin (~ 13 %) und Prolin (~ 13 %). Polare und geladene Aminosäuren wie Histidin, Aspartat, Asparagin, Glutamat und Glutamin sind überhaupt nicht vorhanden oder kommen nur vereinzelt vor. Die vollständigen Aminosäuresequenzen von Elastin der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Arten *Bos taurus* (*BTA*), *Homo sapiens* (*HSA*) und *Xenopus tropicalis* (*XTR*) werden in Abb. A. 1 miteinander verglichen. Dort ist zu sehen, dass die TE-Sequenzen von *BTA* und *HSA* sehr ähnlich sind, während die von *XTR* zwar die typische Domänenstruktur aufweist, die Aminosäuresequenz sich jedoch deutlich unterscheidet. Darüber hinaus sind die Aminosäurezusammensetzungen in Tab. A. 1 wiedergegeben. Das Verhältnis der Aminosäuren von Elastin zueinander ist jedoch über alle elastinenthaltenden Organismen grob konserviert (66). Während die hydrophoben Domänen beim Menschen meist aus sich wiederholenden Sequenzmotiven wie (VGVAPG)<sub>n</sub> bestehen (67), lassen sich die Quervernetzungsdomänen in sogenannte KA-Domänen und KP-Domänen gliedern (68). Die Lysine innerhalb der Quervernetzungsmotive sind meist paarweise oder in einem Triplet angeordnet und durch zwei bis drei andere Aminosäuren voneinander getrennt. Handelt es sich dabei um Alanine, so spricht man von einer KA-Domäne, befindet sich zwischen den beiden Lysinen mindestens ein Prolin, so wird diese als KP-Domäne klassifiziert (vgl. Abb. 3). Domäne 36 verfügt über einen phylogenetisch hoch konservierten C-Terminus, der extrem polar und vierfach positiv geladen ist (66). Hierbei handelt es sich um das Motiv KxxxRKRK. Weiterhin befinden sich in dieser Domäne die beiden einzigen Cysteine, die überdies durch vier Aminosäuren getrennt sind und *in vivo* eine Disulfidbrücke ausbilden (69). Wird diese zerstört, kann TE nur noch mit geringer Affinität an integrale Membranproteine der Zellen binden (70). Außerdem kann TE, dessen C-Terminus entfernt wurde, nur zu einem deutlich geringeren Maß in elastische Fasern eingebaut werden (71). Dabei wird vermutet, dass Domäne 36 mit Proteoglykanen interagiert, die das richtige Ausrichten der TE-Monomere aneinander vermitteln. Darüber hinaus interagiert die Domäne mit dem integralen Membranprotein Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , obwohl es nicht über das spezifische RGD-Erkennungsmotiv verfügt (72,73).

Die Quervernetzung findet in Elastin zwischen den oben beschriebenen Quervernetzungsdomänen statt, wobei unklar ist, welche Domänen miteinander verbunden sind. Die Anordnung und Ausrichtung der einzelnen TE-Monomere vor und während der Quervernetzung wird durch einen Vorgang begünstigt, der als Koazervation bezeichnet wird und für TE einzigartig ist (74,75). Bei der Koazervation handelt es sich um eine intrinsische Eigenschaft von TE, der einer Art Selbstassemblierung gleicht. Dieser Vorgang wird durch die hydrophoben

Domänen, insbesondere durch das repetitive (VPGVG)<sub>n</sub>-Motiv induziert (76). Im Zuge dessen liegen Quervernetzungsdomänen anschließend lösungsmittel exponiert vor (77). Darüber hinaus haben Circular dichroismus-Studien gezeigt, dass TE geordneter vorliegt und sich der  $\alpha$ -helikale Anteil innerhalb der Sekundärstruktur erhöht. Durch die von LOX und LOXL anschließend enzymatisch katalysierte Reaktion reagiert Lysin zu (*S*)-2-Amino-6-oxohexansäure, das auch als Allysin bezeichnet wird (vgl. Abb. 4). Dabei handelt es sich um eine oxidative Desaminierung, wodurch die Aminogruppe am C $\epsilon$ -Atom der Lysinseitenkette in eine extrem reaktive Aldehydfunktion umgewandelt wird (78). Diese kann anschließend sowohl mit der Aldehydfunktion anderer Allysine als auch mit der Aminofunktion von Lysinseitenketten eine kovalente Bindung ausbilden, wodurch die beiden Aminosäuren miteinander irreversibel vernetzt werden. Da die Aminosäuren innerhalb eines Peptidrückgrates angeordnet sind, können auf diese Art unterschiedliche TE-Monomere miteinander verknüpft werden.



**Abb. 4: Generierung der Quervernetzungsaminosäuren in Elastin**

Lineare (nicht quervernetzte) Aminosäuren sind grün beschriftet, bifunktionale Aminosäuren sind blau, trifunktionale und tetrafunktionale Aminosäuren rot beschriftet. Enzyme sind violett markiert. Modifiziert nach Schmelzer (34).

Nach der Kondensation von zwei Aminosäuren bzw. Peptiden miteinander wird die entstehende Aminosäure in der vorliegenden Arbeit als bifunktional bezeichnet, obwohl es sich chemisch gesehen um eine tetrafunktionale Aminosäure handelt. Diese Nomenklatur wurde gewählt, da dies direkt Aufschluss darüber gibt, wie viele Peptidstränge miteinander vernetzt werden können. Die Nomenklatur höherwertig quervernetzter Peptide ist analog dazu. Reagieren zwei Allysine miteinander, so entsteht Allysinaldol (AA). Die entstehende bifunktionale Aminosäure aus Lysin und Allysin wird Dehydrolysinonorleucin ( $\Delta$ -LNL) genannt (32,79). Durch nichtenzymatische Addition von 2 H-Atomen kann  $\Delta$ -LNL *in vivo* zu Lysinonorleucin (LNL) reduziert werden (vgl. Abb. 4). Diese Quervernetzungstypen finden sich auch in Kollagen (80). Für Elastin einzigartig ist jedoch, dass diese Aminosäuren aufgrund der spezifischen Anordnung der Lysine in der Sequenz untereinander zu höherfunktionalen Aminosäuren kondensieren können, in die bis zu fünf Lysinreste involviert sind. Die für Elastin einzigartigen tetrafunktionalen Aminosäuren Desmosin (DES) und Isodesmosin (IDES) entstehen durch Kondensation von drei Allysinen mit einem Lysin und sind rein theoretisch dazu in der Lage, bis zu vier unterschiedliche Peptidstränge miteinander zu verknüpfen. Diese stellen neben den bifunktionalen Aminosäuren in Elastin die wichtigsten quervernetzenden Aminosäuren dar (81-83). Die trifunktionale Aminosäure Dehydromerodesmosin als ein Zwischenprodukt der DES/IDES-Synthese (84) und die pentafunktionalen Aminosäuren Pentasin und Allodesmosin wurden bislang jeweils erst in einer Studie qualitativ nachgewiesen (85,86). Dies lässt darauf schließen, dass sie nur eine untergeordnete Rolle hinsichtlich der dauerhaften Quervernetzung von Elastin spielen. Eine Übersicht der Entstehung der für Elastin typischen Quervernetzungen ist in Abb. 4 gezeigt. Die genaue Ausbildung der Quervernetzungen ist mechanistisch noch nicht verstanden.

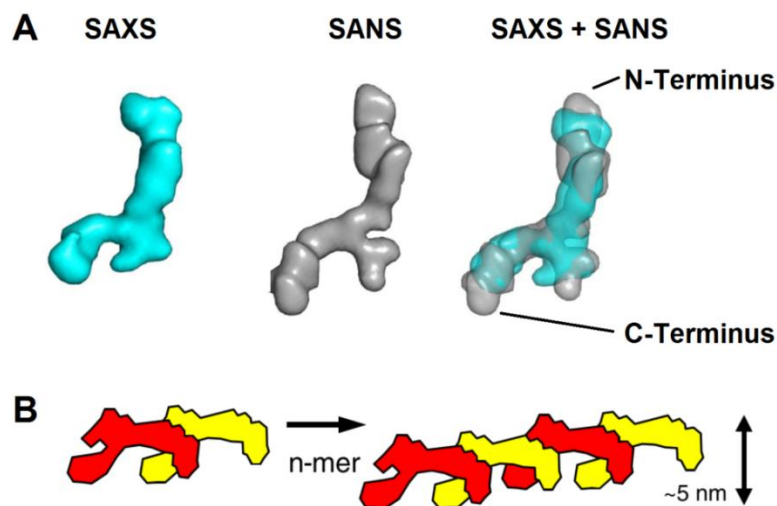
Das Resultat der Quervernetzung von TE-Monomeren miteinander, in die ca. 88 % aller Lysine involviert sind (71), ist reifes Elastin. Dieses unterscheidet sich in seinen physikochemischen und biologischen Eigenschaften deutlich von seinem löslichen Vorläuferprotein TE (87). So ist es in jedem Lösungsmittel unlöslich, extrem hydrophob und weist in isoliertem Zustand eine radiergummiartige Konsistenz auf (88,89). Die für den Organismus wichtigste Eigenschaft von Elastin ist jedoch die namensgebende Elastizität. So wurde gezeigt, dass intaktes Elastin linear auf 150 % seiner ursprünglichen Länge gestreckt werden kann, bevor es bricht (90). Wichtig ist hierbei, dass Elastin hydratisiert vorliegen muss, um elastisch zu sein (91). Trockenes Elastin ist dagegen spröde und brüchig. Warum Elastin elastisch ist, ist bis heute nicht genau verstanden; es existieren jedoch diverse Modelle, die einen entropiegetrie-

benen Prozess vorschlagen (92,93). Die enthaltenen Quervernetzungen dienen, wenn Elastin gedehnt wird, dazu, die mechanische Belastung gleichmäßig über das gesamte Biopolymer zu verteilen. Mechanische Dehnung führt zu einer höheren Ordnung innerhalb des Elastins, wohingegen die Relaxation dazu führt, dass die Entropie wieder zunimmt (34). Tamburro *et al.* erklären die Zunahme der Entropie durch labile  $\beta$ -Schleifen innerhalb der hydrophoben Domänen, die sich dynamisch entlang der Peptidstränge verschieben (94). Insgesamt deuten die bisherigen Erkenntnisse darauf hin, dass die Elastizität von Elastin eher von spezifischen Dynamiken herrührt als aus einer definierten Struktur (34). Eine plausible Erklärung dafür, warum Elastin hydratisiert vorliegen muss, um elastisch zu sein, konnte bislang noch nicht gefunden werden.

Elastin ist nicht durch spezifisch schneidende Proteasen wie die Endoproteinasen AspN und GluC, Trypsin oder Chymotrypsin abbaubar, da entsprechende Aminosäuren in der Sequenz fehlen. Nichtsdestotrotz ist Elastin durch bestimmte Serinproteasen wie Pankreaselastase (PE) (95,96), Cathepsin G (97), humane Leukozytenelastase (98), MMPs wie MMP-7, MMP-9 und MMP-12 (51,53) und Cysteinproteasen wie Cathepsin K, L und S (99) hydrolytisch spaltbar. Proteasen, die dazu in der Lage sind, Elastin abzubauen, werden zusammenfassend auch als Elastasen bezeichnet. Diese wurden bislang nur in tierischen und mikrobiellen Organismen nachgewiesen (96).

Neben der oxidativen Desaminierung von Lysin und dem disulfidverbrückten C-Terminus stellt die partielle Hydroxylierung von Prolinresten an Position 4 zu Hydroxyprolin (Hyp) die einzige weitere bekannte posttranslationale Modifikation (PTM) von Elastin dar. Die Hydroxylierung findet wie auch bei Kollagen durch die Prolyl-4-hydroxylase innerhalb des Cytosols statt, die vorrangig Prolinreste innerhalb des Motivs xPG hydroxyliert. Im Gegensatz zu Kollagen ist die Funktion der partiellen Hydroxylierung der Prolinreste im Elastin noch nicht vollständig verstanden (30,100). Generell ist intaktes Elastin aufgrund der beschriebenen Eigenschaften strukturellen Untersuchungen sehr schwer zugänglich (101). Aktuelle Forschungen fokussieren sich zum großen Teil auf die strukturelle Analyse von TE, um daraus dann Eigenschaften für Elastin und die Entstehung Elastins abzuleiten (102-108). So wurde vor kurzem, basierend auf Streuungsdaten von SAXS/SANS (Kleinwinkelröntgen-/Kleinwinkelneutronenstreuung, engl. *small angle X-ray/neutron scattering*)-Experimenten der Oberflächenstruktur von TE (vgl. Abb. 5 A), das sogenannte *head-to-tail*-Modell vorgestellt (vgl. Abb. 5 B), das beschreibt, wie sich die einzelnen Monomere im Zuge der Vernetzung untereinander orientieren (109).

Obwohl die diversen Quervernetzungstypen gut bekannt sind, gibt es dennoch so gut wie keine Informationen darüber, welche Domänen exakt miteinander quervernetzt sind. Ob neben interpeptidalen Quervernetzungen auch Quervernetzungen innerhalb eines TE-Monomers gebildet werden, ist darüber hinaus bislang ebenso wenig bekannt, wie die Antwort auf die Frage, ob Domänen jeweils spezifisch mit anderen verknüpft werden oder ob eine Domäne mit vielen anderen Domänen verbunden sein kann. Erst in einer Studie wurde bislang zweifelsfrei ein quervernetztes Peptid aus Elastin (isoliert aus *Sus scrofa*) aufgeklärt. In dieses waren die drei Quervernetzungsdomänen 10, 19 und 25 involviert (110). Aufgrund des fehlenden Wissens über das Quervernetzungsmuster von Elastin ist überdies unbekannt, wie die einzelnen TE-Monomere innerhalb der elastischen Fasern angeordnet sind und inwiefern dies Einfluss auf die Elastizität hat.



**Abb. 5: Oberflächenstrukturen und Polymerisierung von humanem TE**

[A] Die Oberflächenstruktur von rekombinanten humanem TE IF 2 gewonnen aus SAXS- und SANS-Daten sowie die Überlagerung beider Datensätze. [B] Das neu propagierte *head-to-tail*-Modell zeigt, wie sich die einzelnen TE-Monomere im Zuge der Elastogenese aneinander ausrichten. Modifiziert nach Baldock *et al.* (109).

Studien hierzu werden bislang über Elektronenmikroskopie sowie über Festkörper-Nuklearmagnetresonanzspektroskopie (Festkörper-NMR) durchgeführt, liefern jedoch nur grob aufgelöste Daten (111).

## 1.2 Grundlagen der Massenspektrometrie

Bei der Massenspektrometrie (MS) handelt es sich um eine analytische Technik zur Bestimmung der Masse und Ladung geladener Moleküle. Es wird niemals direkt die Masse ge-

messen, sondern jeweils das Masse-zu-Ladung-Verhältnis. Durch Isotopenmuster, die aufgrund der natürlichen Häufigkeit der Isotope auftreten, lässt sich der Ladungszustand des Analyten und somit auch die Masse bestimmen (112). MS wurde bereits in den 1950er Jahren entwickelt und hat in den letzten Jahrzehnten bedeutende technische Fortschritte gemacht. Heutzutage existiert eine Vielzahl verschiedener Instrumente. In diesem Kapitel werden die Grundlagen der massenspektrometrischen Analyse erläutert sowie die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Massenspektrometer näher beschrieben.

### 1.2.1 Aufbau eines Massenspektrometers

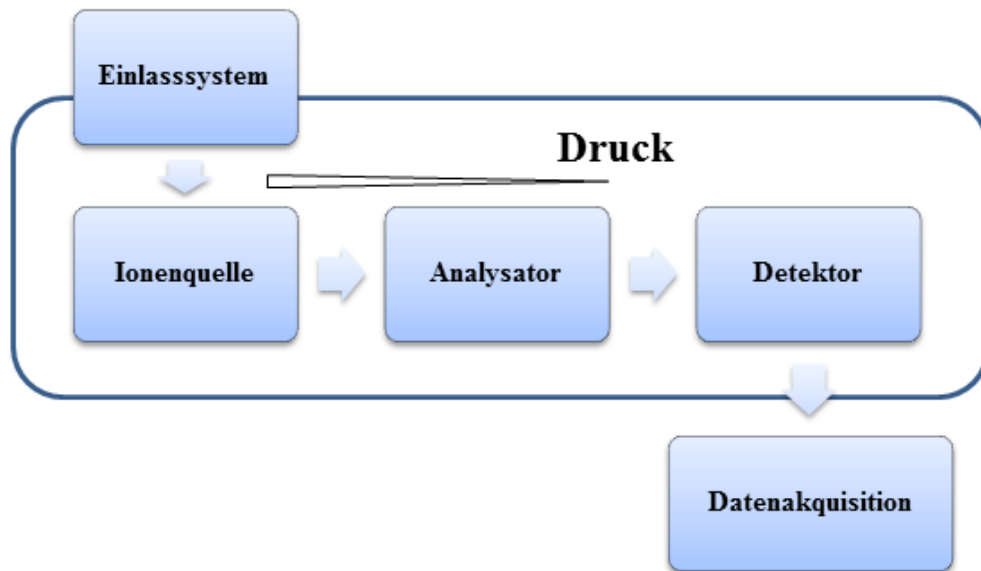
Massenspektrometer sind grundsätzlich, so verschieden sie sonst sein mögen, aus den gleichen drei Grundelementen aufgebaut: der Ionenquelle, dem Analysator und dem Detektor (siehe Abb. 6). Die Ionenquelle dient dazu, den Analyten, der fest, flüssig oder gasförmig sein kann, zunächst zu ionisieren, da ungeladene Moleküle mittels MS nicht detektiert werden können. Die Ionisation kann dabei entweder unter Atmosphärendruck oder im Vakuum erfolgen. Im Analysator werden die geladenen Teilchen entsprechend ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses ( $m/z$ ) aufgetrennt, bevor sie auf den Detektor treffen und dort nachgewiesen werden. Die Datenaufnahme und Steuerung ist softwaregesteuert.

Die Massenspektrometrie findet heutzutage Verwendung in der qualitativen und quantitativen Analyse unterschiedlichster Substanzen wie z.B. von Arzneistoffen (113), Sprengstoffen (114), Lipiden (115), Nukleinsäuren (116,117), intakten Proteinen (118), Peptiden (119) und Metaboliten (120). Abhängig von dem jeweiligen Forschungsgebiet ist der Einsatz unterschiedlicher Ionisationsmethoden und Analysatoren erforderlich.

Die Anzahl der verfügbaren Ionisationsmethoden umspannt ein großes Spektrum, wobei zwischen harten und weichen Ionisationsmethoden unterschieden werden kann (121). Zu den harten Ionisationsmethoden zählen die chemische Ionisierung (122), Elektronenstoßionisation (123) sowie Feldionisation (124). Diese werden vorrangig zur Analyse kleiner Moleküle verwendet und spielen in der Proteinanalytik keine Rolle, da im Zuge der Ionisation der Analyt bereits teilweise zerstört wird. So haben sich zur Analyse von Proteinen und Peptiden weiche Ionisationsmethoden wie die Elektronensprayionisation (ESI) (125), sowie deren Weiterentwicklung nanoESI (126) und die matrixunterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) (127) etabliert (128). Der Analysator dient dazu, Ionen aufgrund ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses zu trennen. Es steht eine große Bandbreite von Analysatoren zur Verfügung, die sich zunächst darin unterscheiden, ob die Trennung räumlich oder zeitlich erfolgt. Gemein ist



ihnen, dass die Trennung zur Vermeidung von Stößen mit Gasmolekülen im Hochvakuum stattfindet (129). Abhängig von dem Analysator sind auch das Trennvermögen und die Sensitivität sehr unterschiedlich. Zu den verbreitetsten Analysatoren in der Proteinanalytik zählen der Quadrupol, der Flugzeitanalysator (engl. *time of flight*, TOF), die lineare Ionenfalle sowie der Orbitrap-Massenanalysator.



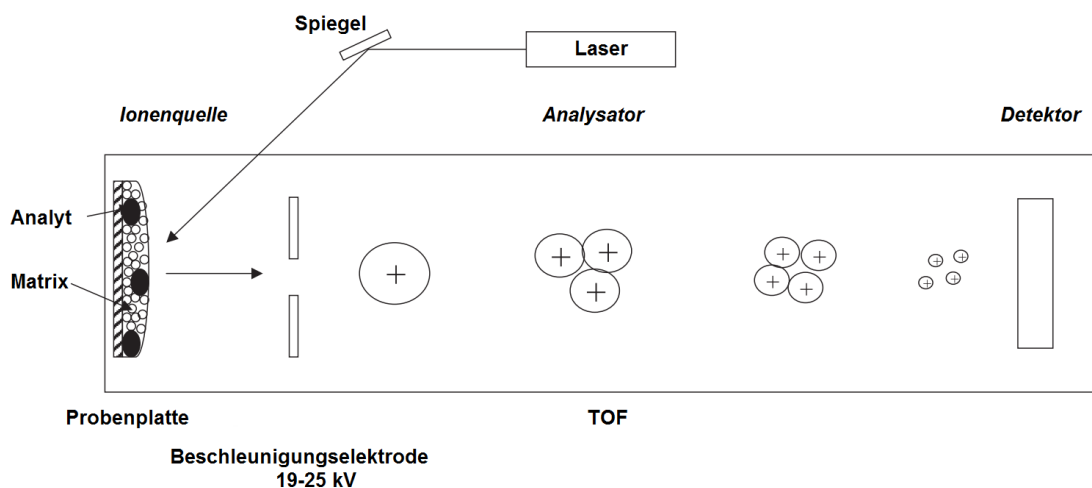
**Abb. 6: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers**

Die drei zentralen Bestandteile Ionenquelle, Analysator sind als direkter Teil des Massenspektrometers extra blau umrandet abgebildet. Der Druck wird in Richtung Detektor kleiner.

Da Analysatoren fast beliebig miteinander gekoppelt werden können, ergibt sich eine hohe Diversität der Geräte, die auch als Hybridinstrumente bezeichnet werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Hybridmassenspektrometer werden in Kap. 1.2.3-1.2.5 vorgestellt. Als Detektor dienen heutzutage meist Mikrokanalplatten bzw. Sekundärelektronenvervielfacher. Das erhaltene Spektrum ist eine Funktion der Intensität gemessener Ionen in Bezug auf ihr Masse-zu-Ladung-Verhältnis. Dieses kann in der Einheit Thomson (Th) angegeben werden (130). In Orbitrap-Instrumenten werden Ionen nicht direkt detektiert, sondern Ströme gemessen, die mittels Fourier-Transformation in  $m/z$ -Werte zurückgerechnet werden (131,132). Dadurch können diese mehrfach gemessen werden, was die Massengenauigkeit dieser Geräte gegenüber anderen Analysatoren entscheidend erhöht.

## 1.2.2 MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer

Die heutzutage häufig verwendete MALDI-Technik zur schonenden Ionisierung von großen Biomolekülen wurde Ende der 1980er Jahre von Karas und Hillenkamp entwickelt (127,133). Es handelt sich hierbei um eine Weiterentwicklung der Laserdesorption, bei der hohe Energien und Hitzeschübe vermieden werden. Die schonende Ionisierung des Analyten wird bei MALDI als Ionisationsmethode dadurch erreicht, dass der Analyt mit einer im Überschuss zugegebenen niedermolekularen Matrixsubstanz auf einer Metallplatte kokristallisiert und so in die Matrix eingebettet wird. Als Matrices werden in der Peptid- und Proteinanalytik meist Zimtsäurederivate wie  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycimtsäure (CHCA) (134) sowie Sinapinsäure (SA) verwendet (135). Die beschichtete Platte wird anschließend in das unter Hochvakuum stehende Massenspektrometer eingebracht. Durch den Beschuss mit einem gepulsten Laser bei einer Dauer von ungefähr 3 ns - 10 ns, bei dessen Wellenlängen die Matrix absorbiert (meist 337 nm oder 355 nm), erfolgt das explosionsartige Aufbrechen des Kristallgitters. Die applizierte Energie beträgt meist zwischen  $1 \times 10^7 \text{ W cm}^{-2}$  und  $5 \times 10^7 \text{ W cm}^{-2}$  (136). Bei MALDI handelt es sich um eine gepulste Ionisationsmethode. Dies bedeutet, dass Ionen nicht kontinuierlich, sondern nur stoßweise durch den Laserbeschuss erzeugt werden. Der schematische Aufbau eines MALDI-TOF-Gerätes ist in Abb. 7 dargestellt.



**Abb. 7: Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF Massenspektrometers**

Die einzelnen Bestandteile sind innerhalb der Abbildung beschriftet. Der unter Hochvakuum stehende Teil des Instrumentes ist umrandet dargestellt. Modifiziert nach Marvin *et al.* (137).

Während dieses Desorptionsvorganges wird die Ladung von der Matrix auf den Analyten übertragen, wobei der Analyt anschließend meist einfach geladen vorliegt. Der genaue Ionisierungsprozess ist bis heute nicht exakt verstanden. Vielmehr existiert eine Vielzahl vorge-

schlagener Modelle (138,139). Bei dem nachgeschalteten Analysator des in dieser Arbeit verwendeten Massenspektrometers handelt es sich um ein TOF, das Ionen entsprechend der Zeit auftrennt, die sie benötigen es vollständig zu durchlaufen. Nach Beschuss mit dem Laser werden die Ionen zunächst in der Quelle gesammelt, anschließend nachbeschleunigt und im feldfreien TOF aufgetrennt. Zur erneuten Beschleunigung der Ionen werden zur Kompensation der bereits vorhandenen internen Energie hohe Spannungen im Bereich von 19 kV - 25 kV verwendet (140). Die Flugzeit des Analyten steht in folgendem Verhältnis zu der Zeit, die er benötigt, um das TOF zu durchwandern (141):

$$t = s \sqrt{\frac{m}{(2E)z}} \quad \text{Gleichung 1}$$

Die Flugzeit  $t$  steht dabei in proportionalem Zusammenhang zur Wegstrecke  $s$  sowie zur Wurzel des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses  $m/z$  (siehe Gleichung 1). Als weiterer Faktor fließt die kinetische Energie  $E$  ein. Letztere muss zur korrekten Berechnung des  $m/z$ -Wertes konstant gehalten werden. Da es sich bei dem TOF um einen diskontinuierlichen Analysator handelt, wird er meist in Verbindung mit der gepulsten MALDI-Technik als Ionisationsmethode verwendet. Chromatographisch getrennte Peptidmischungen können lediglich *offline* analysiert werden, indem das zuvor aufgetrennte Eluat durch einen Pipettierroboter in bestimmten Zeitintervallen auf den MALDI-Probenräger aufgetragen und anschließend sequentiell analysiert wird (142). Zusätzlich können bei dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten 4800 MALDI-TOF/TOF Instrument (Sciex, Darmstadt) Ionen zur Tandemmassenspektrometrischen Analyse durch einen zwischengeschalteten *timed ion selector* isoliert werden. Die Fragmentierung erfolgt ggf. anschließend sowohl durch einen metastabilen Zerfall des entsprechenden Vorläuferions, der durch die höhere Laserenergie induziert wird (Laserinduzierte Dissoziation, engl. *laser-induced dissociation*, LID), als auch durch eine zwischengelagerte Zelle, in die Luft mit dem darin enthaltenden Stickstoff als Inertgas eingeleitet wird (143). Die Stöße des Analyten mit den Gasmolekülen bewirken wiederum die Dissoziation des Analyten (Kollisionsinduzierte Dissoziation, engl. *collision-induced dissociation*, CID). Nachteilig bei diesem Instrument ist, dass der Grad der Dissoziation nur bedingt geregelt werden kann. Eine Erhöhung der Laserenergie führt ab einem gewissen Wert nicht mehr zwangsläufig zu einem höher dissoziierten Vorläuferion (144). Die Auflösung  $R$  des

verwendeten Instrumentes beträgt 20.000. Dabei wird die Auflösung bei MS-Instrumenten nach folgender Gleichung 2 berechnet:

$$R = \frac{m}{FWHM} \quad \text{Gleichung 2}$$

Dabei ist R das Massenaufklärungsvermögen, m der entsprechende  $m/z$ -Wert und FWHM die Halbwertsbreite (engl. *full width at half maximum*) des Peaks.

### 1.2.3 Kopplung von chromatographischen Methoden mit ESI- MS

ESI stellt ähnlich wie MALDI eine Methode zur schonenden Ionisierung von Molekülen dar. Bei der von John Fenn 1989 für MS applizierten Methode handelt es sich um eine Ionisationsmethode für die der Analyt gelöst vorliegen muss (125). Für die Entwicklung der ESI-Methode erhielt Fenn 2002 den Nobelpreis für Chemie. Bei ESI wird meist ein polares organisches Lösungsmittel mit geringer Oberflächenspannung gewählt (145). Der gelöste Analyt wird anschließend unter Atmosphärendruck zu einem feinen Nebel mit einer Tröpfchengröße von wenigen Mikrometern versprüht. Durch Anlegen einer Spannung zwischen der Sprühkapillare mit einem Durchmesser von ca. 100  $\mu\text{m}$  - 200  $\mu\text{m}$  und der Gegenelektrode laden sich die enthaltenen Analytmoleküle elektrisch auf, während das Lösungsmittel durch einen angelegten beheizten Gasstrom evaporiert. Die Ladung an der Oberfläche der Tropfen nimmt mit sinkender Größe immer mehr zu, wodurch es zu einem explosionsartigen Zerfall dieser in lösungsmittelfreie Ionen kommt - der Coulomb-Explosion. Der Zustand, in dem dies passiert, wird als Rayleigh-Limit bezeichnet (146). Vollständig desolvatisierte Ionen werden durch den Einsatz eines Skimmers, einer minimalen Öffnung im Gerät, in den unter Hochvakuum stehenden Analysator ( $\leq 8 \times 10^{-6}$  bar) transportiert. Die beobachteten Ladungszustände des Analyten nehmen mit zunehmender Molekülgröße zu und sind weiterhin abhängig von Lösungsmitteladditiven und der dreidimensionalen Struktur des Analyten (147). Für denselben Analyten können in einer Messung unterschiedliche Ladungszustände gleichzeitig beobachtet werden.

Bei nanoESI handelt es sich prinzipiell um die gleiche Methode mit dem Unterschied, dass Sprühkapillaren mit einem Spitzendurchmesser von 5  $\mu\text{m}$  - 20  $\mu\text{m}$  verwendet werden und die Flussrate bei 0,1  $\mu\text{l min}^{-1}$  - 0,4  $\mu\text{L min}^{-1}$  liegt. Dieser Umstand führt dazu, dass sich die Tröpfchengröße ungefähr um den Faktor 100 reduziert. Infolgedessen können kleinere

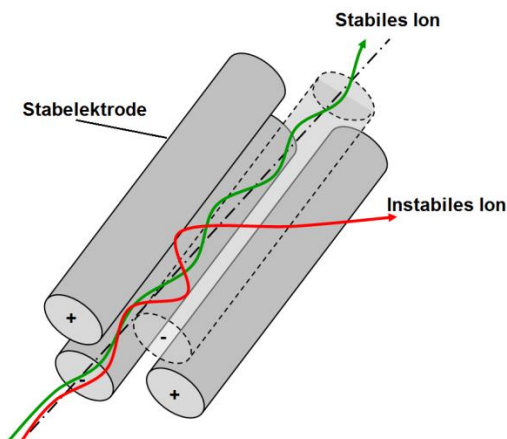
Spannungen bei erhöhter Sensitivität verwendet werden. In der Protein- und Peptidanalytik ist nanoESI als Standardmethode heutzutage etabliert.

Durch Kopplung der nanoESI-Sprühkapillare mit der Kapillare einer nanoHPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl. *high performance liquid chromatography*), die das Eluat transportiert, lässt sich erreichen, dass zuvor flüssigkeitschromatographisch (engl. *liquid chromatography*, LC) getrennte Moleküle direkt im Massenspektrometer analysiert werden können. Diese *online*-Kopplung findet in der Proteinanalytik meist bei der Analyse komplexer Peptidgemische statt. Bei der nanoHPLC handelt es sich meist um eine Umkehrphasenflüssigkeitschromatographie (engl. *reversed phase liquid chromatography*, RP-LC) mit C18-Resin-Ketten als Säulenmaterial (148). Je nach Komplexität des Peptidgemisches kann die Länge des Gradienten angepasst werden bzw. eine zweidimensionale LC-Separationsmethode verwendet werden (149).

### 1.2.4 NanoESI-QqTOF Massenspektrometer

Bei dem QqTOF MS handelt es sich um ein Quadrupol-Flugzeit-Hybrid-Massenspektrometer (Markenname Q-TOF-2, Waters, Manchester, Großbritannien), das entweder mit einer nanoESI-Quelle oder einer ESI-Quelle ausgestattet werden kann, wie unter 1.2.3 beschrieben ist. Die entstehenden mehrfach geladenen Ionen gelangen zunächst in einen Quadrupolanalysator, der bereits 1958 von Paul *et al.* (150) entwickelt und seitdem stetig weiterentwickelt wurde. Ein Quadrupol kann entweder als Massenfilter oder zur zielgerichteten Ionenführung fungieren. Wie in Abb. 8 ersichtlich, ist ein Quadrupol aus vier entlang einer Längsachse zylindrisch angeordneten Stabelektroden aufgebaut (151). Die sich diagonal gegenüberliegenden Elektroden besitzen jeweils das gleiche elektrische Potenzial, das sich aus je einer Gleich- und einer Wechselstromkomponente zusammensetzt. Das hierdurch erzeugte hochfrequente elektrische Feld regt die Ionen zu einer oszillierenden Flugbahn an. Über das angelegte Potenzial mit entsprechender Frequenz wird reguliert, dass jeweils nur Ionen eines bestimmten  $m/z$ -Bereiches den Quadrupol auf stabiler Bahn durchlaufen können, während die anderen Ionen instabile Flugbahnen einnehmen und gegen die Stäbe prallen bzw. den Quadrupol anderweitig verlassen. Ob sich ein Ion stabil verhält, wird durch die sogenannten *Mathieu'schen* Differentialgleichungen beschrieben (152). Abhängig davon, ob alle Ionen den Quadrupol passieren können oder ob nur Ionen eines eng gewählten  $m/z$ -Bereiches (meist 1 Th bis 3 Th) durchgelassen werden, dient der Quadrupol in dem hier beschriebenen Gerät entweder als reiner Ionenpfad (engl. *radio frequency (RF)-only-Modus*) oder als Massenfilter.

Die hochauflösende Analyse der Ionen auf MS- und Tandem-MS-Ebene erfolgt unabhängig davon in einem nachgeschalteten orthogonal angeordneten TOF mit Reflektor ähnlich wie in Kap. 1.2.2 beschrieben (153).



**Abb. 8: Aufbau des Quadrupol-Massenanalysators**

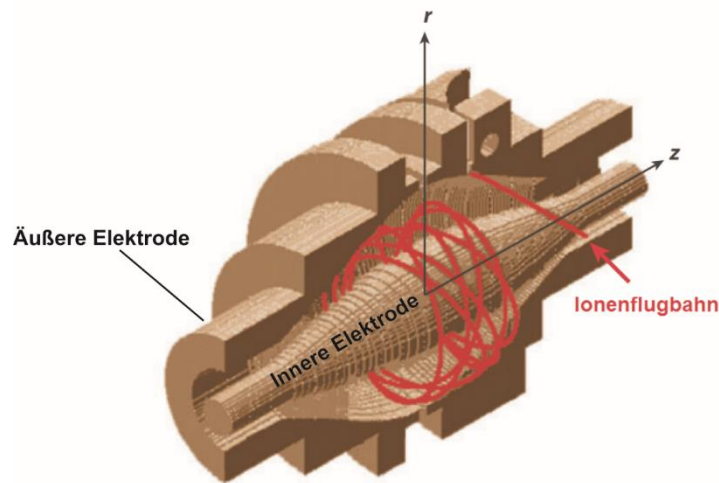
Die Ionenflugbahnen sind rot (instabil) bzw. grün (stabil) markiert. Die entsprechenden elektrostatischen potenziäle sind mit [+] und [-] gekennzeichnet. Modifiziert nach (154).

Vor dem Durchlaufen des TOFs werden Ionenpakete gebündelt und durch einen sogenannten *Pusher* zeitgleich in das TOF gegeben. Im Falle einer Tandemmassenspektrometrischen Analyse erfolgt die Fragmentierung durch CID in einem zwischengeschalteten Hexapol, der als Kollisionszelle fungiert, mittels der Kollision mit dem Inertgas Argon. Über die Kollisionsenergie lässt sich der Grad der Dissoziation variieren (155). Die Auflösung  $R$  liegt bei 9.500.

### 1.2.5 NanoESI-Orbitrap Massenspektrometer

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Hybridinstrumente verwendet, deren wichtigster Analysator der sogenannte Orbitrap-Massenanalysator ist. Bei diesem von Alexander Makarov entwickelten Analysator handelt es sich um eine Weiterentwicklung der Kingdon-Falle (156). Hierbei handelt es sich um eine bereits 1923 entwickelte Methode, um Ionen elektrostatisch einzufangen, indem diese eine zentrale Elektrode umkreisen. Weiterentwickelt wurde dieses Prinzip durch Knight (157). Die Methode wurde von Makarov dahingehend modifiziert, dass sie auch die Detektion der Ionen ermöglicht (132). Seit 2005 werden Orbitrap-Hybridinstrumente von der Firma *Thermo Fisher Scientific Inc.* kommerziell vertrieben (158). Der Analysator ist nur wenige Zentimeter groß und besteht aus einer spindelförmigen inneren

Elektrode, die von einer fassförmigen, in der Mitte offenen Außenelektrode umgeben ist (vgl. Abb. 9).



**Abb. 9: Aufbau des Orbitrap-Massenanalysators**

Gezeigt ist die innere spindelförmige Elektrode, die von der fassförmigen äußeren Elektrode umgeben ist. Die Raumkoordinaten sind durch  $r$  (orbital) und  $z$  (longitudinal) zur inneren Elektrode angegeben. Die zeitaufgelöste Ionenflugbahn ist rot dargestellt. Modifiziert nach Hu *et al.* (158).

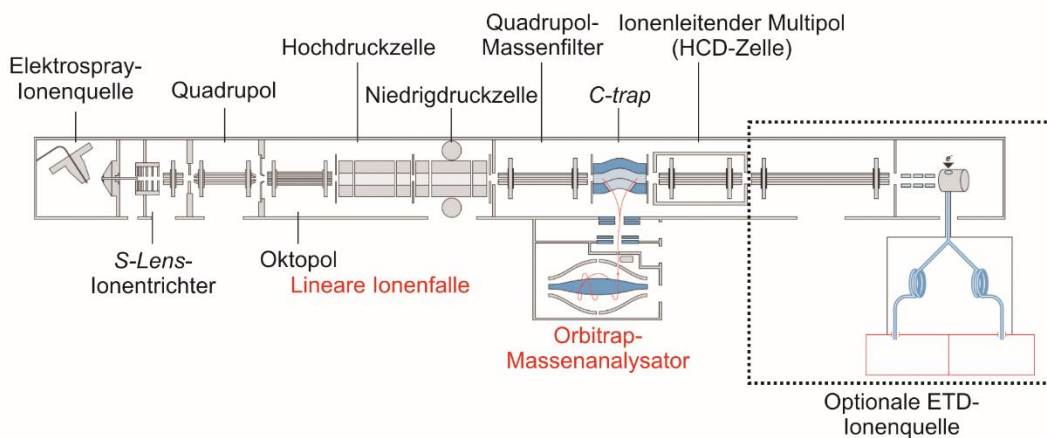
Diese ist in der Mitte offen. Ionen, die in die Orbitrap gelangen, bewegen sich sowohl auf orbitalen Bahnen harmonisch um die zentrale Elektrode in Richtung  $r$  als auch aufgrund der Form des elektrostatischen Feldes longitudinal zur Spindel auf der  $z$ -Achse (158). Dabei ist die axiale Oszillationsfrequenz unabhängig von der initialen Energie und der räumlichen Ausdehnung der Ionen. Oszillationsfrequenzen der Ionenströme werden nicht-destruktiv anhand der an der Außenseite der Elektroden erzeugten Bildströme gemessen.

$$\omega = \sqrt{k * \frac{z}{m}} \quad \text{Gleichung 3}$$

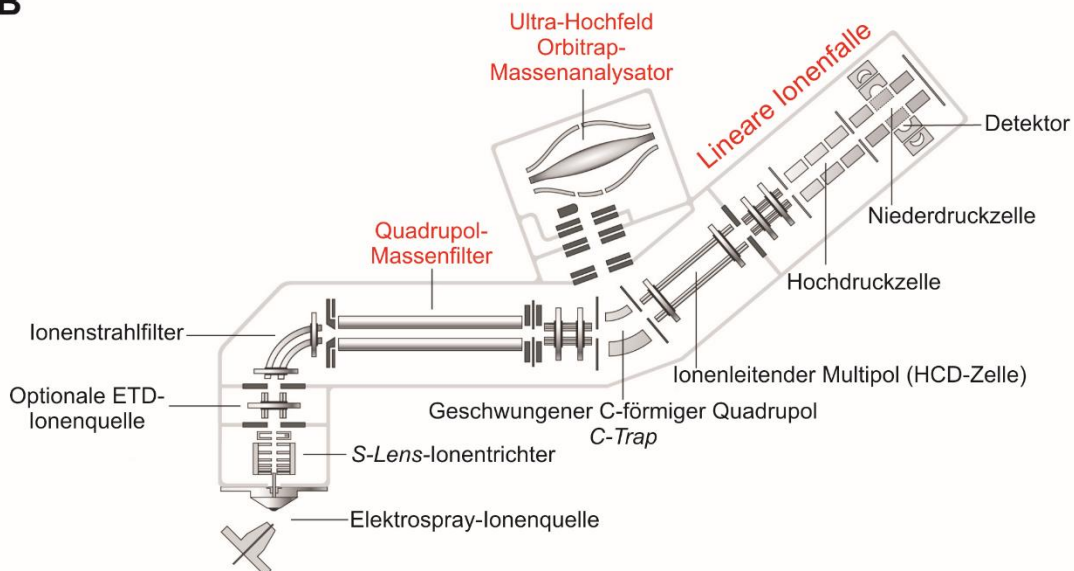
Weil sich die Oszillationsfrequenz  $\omega$  umgekehrt proportional zur Wurzel des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses bewegt, können durch eine schnelle Fouriertransformation die entsprechenden  $m/z$ -Werte der Ionen berechnet werden.  $k$  stellt die Feldkonstante der Krümmung des elektrostatischen Feldes innerhalb des Analysators dar (vgl. Gleichung 3). Der Orbitrap-Analysator zeichnet sich durch ein hohes Massenaufklärungsvermögen ( $R \geq 100.000$ ) in Verbindung mit hoher Sensitivität und leichter Handhabung aus. Der dynamische Bereich beträgt fünf Größenordnungen, weswegen er heutzutage oft in der quantitativen Analyse von Proteomics- und Metabolomics-Proben eingesetzt wird (159,160). Bei den in der vorliegenden Ar-

beit verwendeten Hybridinstrumenten handelt es sich um das LTQ-Orbitrap Velos Pro MS sowie das Orbitrap Fusion Tribrid MS (vgl. Abb. 10). Die Ionen werden bei beiden Instrumenten in einer nanoESI-Quelle erzeugt und gelangen beim Velos Pro MS (vgl. Abb. 10 A) zunächst in einen *S-Lens*-Ionenrichter und von dort in die Ionentransferoptiken (161). Über diese werden die Ionen in die lineare Ionenfalle transportiert. Hierbei handelt es sich um einen dreifach segmentierten Quadrupol (engl. *linear trap quadrupole*, LTQ). Die Detektion von Ionen kann dort niedrig aufgelöst bei hoher Sensitivität erfolgen. Über das AGC (Automatische Verstärkungsregelung, engl. *automatic gain control*)-Modul wird kontrolliert, dass nicht zu viele Ionen gleichzeitig in die Falle gelangen.

**A**



**B**



**Abb. 10:** Schematischer Aufbau der nanoESI-Hybridinstrumente Orbitrap Velos Pro MS und Orbitrap Fusion Tribrid MS



Analysatoren, die nicht nur als reine Transferoptiken dienen, sind rot markiert. [A] Orbitrap Velos Pro MS modifiziert nach [www.planetorbitrap.com/orbitrap-velos-pro](http://www.planetorbitrap.com/orbitrap-velos-pro); Stand: November 2015. [B] Orbitrap Fusion Tribrid MS modifiziert nach Senko *et al.* (162).

Hierzu wird eine kurze niedrig aufgelöste Vormessung (engl. *pre-scan*) durchgeführt, die den Totalionenstrom (engl. *total ion current*, TIC) misst und basierend darauf die Füllzeit der LTQ berechnet (161). Ionen können von der LTQ axial weiter in den geschwungenen C-förmigen Quadrupol (*C-trap*) gelangen und werden dort zunächst abgebremst, bevor sie durch einen Hochspannungspuls in den Orbitrap-Analysator eingeschleust werden. An der Zentralelektrode liegt im Positivmodus ein Potenzial von -3,5 kV an, während die Außenelektrode geerdet ist. Ionen können in der linearen Ionenfalle selektiert und anschließend durch CID oder HCD (Höherenergetische Dissoziation, engl. *higher-energy collisional dissociation*) dissoziiert werden. Die Dissoziation im HCD-Modus findet in einem nachgeschalteten Multipol statt. Fragmentationen gelangen anschließend über die *C-trap* in den Orbitrap-Analysator und können dort mit hoher Massengenauigkeit analysiert werden. Die Fragmentierung durch CID findet in der linearen Ionenfalle mittels kinetischer Anregung statt. Entstehende Fragmentationen werden dort bei niedrigem Massenaufklärungsvermögen, aber hoher Empfindlichkeit detektiert. Der Dissoziationsgrad lässt sich durch die Erhöhung der Kollisionsenergie ändern. Diese wird bei Orbitrap-Instrumenten als normalisierte Kollisionsenergie (NE) angegeben. Eine Fragmentierung via Elektronentransferdissoziation (engl. *electron transfer dissociation*, ETD) durch Fluoranthenradikationen ist optional möglich, das entsprechende Modul war in dem verwendeten Gerät jedoch nicht installiert.

Das Orbitrap Fusion Tribrid MS ist ein 2013 vorgestelltes Hybridinstrument, das drei verschiedene Massenanalysatoren in einem Gerät vereint (162): einen Quadrupol-Massenfilter, einen Ultra-Hochfeld-Orbitrap-Massenanalysator und eine lineare Ionenfalle, die T-förmig zueinander angeordnet sind (vgl. Abb. 10 B). Ionen gelangen über einen *S-Lens*-Iontrichter zunächst in den Ionenstrahlfilter, dessen geschwungene Form dafür sorgt, dass Neutralteilchen effektiv abgetrennt werden. Der nachfolgend angeordnete Quadrupol-Massenfilter erlaubt die Selektion von Ionen in einem orthogonalen Massenfenster. Die T-förmige Anordnung der Analysatoren zueinander verringert einerseits den Abstand zwischen der Ionenquelle und diesen, wodurch Ionenverluste reduziert werden und somit die Sensitivität erhöht wird. Durch die Anordnung der linearen Ionenfalle hinter der *C-trap* können Ionen zusätzlich dort mittels CID und ETD fragmentiert und anschließend im Orbitrap-Massenanalysator mit hoher Massengenauigkeit gemessen werden (162). Das elektrostatische Potenzial des Orbitrap-Massenanalysators wurde von -3,5 kV auf -5,0 kV erhöht, wodurch das Massenaufklärungs-

vermögen um 18 % verbessert wurde (163). Ein verringerter Druck in der linearen Ionenfalle verbessert dies zusätzlich. Das Instrument bietet eine maximale Auflösung von 450.000 bei  $m/z$  200 und einer Scanrate von 20 Hz.

## 1.3 Massenspektrometrie in der Proteinanalytik

Die Massenspektrometrie hat sich innerhalb der letzten 25 Jahre durch die Entwicklung der Ionisationsmethoden ESI und MALDI zu einer Standardmethode der Proteinbiochemie zur Identifizierung und Analyse von komplexen Proteingemischen (Proteomics-Experimente), einzelnen Proteinen sowie Peptiden entwickelt (164). Im Zuge dessen wurden inzwischen andere Verfahren zur Sequenzierung von Proteinen wie der Edman-Abbau (165-167) nahezu vollständig verdrängt.

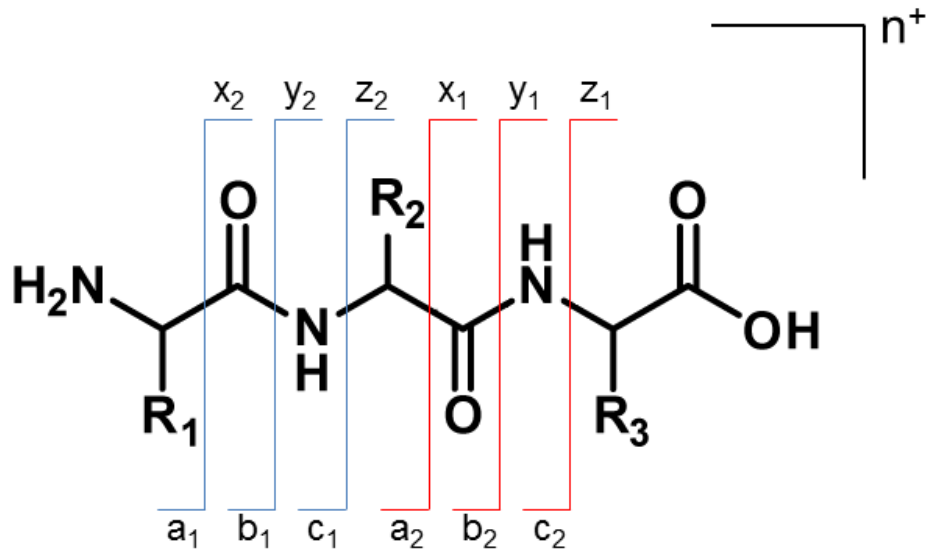
### 1.3.1 Identifizierung von Proteinen und Peptiden

Die Analyse und Identifizierung von Proteinen mittels MS kann über eine „*top-down*“- oder „*bottom-up*“-Strategie erfolgen. Bei der „*top-down*“-Strategie werden intakte Proteine mittels MS analysiert, während die Proteine bei der populäreren „*bottom-up*“-Methode zuvor durch den Einsatz von Proteasen in Peptide gespalten werden (168). Nach einer chromatographischen Vortrennung, meist durch RP-LC, in der Peptide nach ihrer Hydrophobizität getrennt werden (169), werden diese zeitaufgelöst im MS analysiert (119). Elastin lässt sich massenspektrometrisch nur durch „*bottom-up*“-Methoden untersuchen, da es ein unlösliches, komplexes Netzwerk aus kovalent quervernetzten Molekülen darstellt und als Polymer keine definierte Masse besitzt.

Eine Bestimmung der Aminosäuresequenz von Peptiden allein aufgrund der Masse ist oftmals nicht möglich, da diese zum einen nichts über die Anordnung der Aminosäuren im Peptid verraten kann und zusätzlich mit steigender Anzahl der Aminosäuren Peptide unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung das gleiche oder ein ähnliches MW besitzen. Abhängig von der Massengenauigkeit des verwendeten Instruments kann so mitunter nicht mehr zwischen isobaren Peptiden unterschieden werden. Deshalb können Vorläuferionen im MS selektiert und anschließend in kleinere Fragmente gespalten werden (Tandem-MS, MS/MS, MS<sup>2</sup>). Weiterhin wird in der massenspektrometrischen Peptidanalytik zwischen der datenabhängigen Fragmentierung von Vorläuferionen (engl. *data dependent acquisition*, DDA) und der datenunabhängigen Fragmentierung (engl. *data independent acquisition*, DIA) unter-

schieden (170). Der Unterschied liegt darin, dass in DDA-Experimenten auf Basis des Vorläuferionenspektrums abundante Ionen ausgewählt werden, die anschließend in der sich anschließenden Tandem-massenspektrometrischen Analyse fragmentiert werden. Dadurch wird jedoch ein Großteil aller Vorläuferionen nicht fragmentiert (171). Bei DIA-Experimenten hingegen werden unabhängig von dem Vorläuferionenspektrum alle Ionen oder alle Ionen zyklisch durchlaufener Massenfenster gleichzeitig fragmentiert. Die Aufnahme von Vorläuferionenspektren und Fragmentationenspektren erfolgt abwechselnd. Fragmentationen werden dann hauptsächlich aufgrund von sich überschneidenden Retentionszeitprofilen dem jeweiligen Vorläuferion zugeordnet. Der Vorteil bei DIA-Experimenten liegt darin, dass theoretisch alle Peptide gleichzeitig erfasst werden, während bei DDA-Experimenten nur ein kleiner Teil aller Vorläuferionen in Echtzeit ausgewählt werden kann. Der Nachteil liegt in einer verminderten Qualität der DIA-Spektren gegenüber den DDA-Spektren (170). So sind bei Fragmentspektren aus DDA-Experimenten die beobachteten Ionen zwangsläufig die Fragmentationen des selektierten Vorläuferions. Durch Überlappung von Retentionszeitprofilen ähnlich hydrophiler Peptide kann es bei DIA-Experimenten in dieser Hinsicht zu Ambiguitäten kommen, was zu einer falschen Zuordnung der Fragmentationen führt.

Die entstehenden Ionen sind in jedem Fall durch den Zerfall von Vorläuferionen entstanden und werden als Fragment- oder auch Produktionen bezeichnet. Die am meisten verwendete Fragmentierungstechnik in der Proteinanalytik ist CID. Durch die Kollision von Peptiden mit Gasmolekülen eines Inertgases (z.B. N<sub>2</sub>, Ar, He, Xe oder Kr) wird vorrangig die Peptidbindung zwischen dem Carbonyl-Kohlenstoff und Stickstoff gespalten. Abhängig davon, ob die Ladung am N-terminalen Teil oder am C-terminalen Teil des gespaltenen Peptides verbleibt, werden die entstandenen Ionen als b- oder y-Ionen bezeichnet. Neutralverluste können nicht direkt nachgewiesen werden. Die Nomenklatur entstehender Fragmentationen bei der Dissoziation von Peptiden ist in Abb. 11 angegeben. Die Dissoziationsmethode LID ist auf MALDI-Instrumente beschränkt, führt jedoch ebenfalls zu der Dissoziation der Peptidbindung und somit zu b- und y-Ionen. Als alternative Technik zur Dissoziation von Peptiden mittels CID haben sich vorrangig Elektroneneinfangdissoziation (engl. *electron capture dissociation*, ECD) (172) und ETD etabliert (173,174). Diese Methoden führen durch die Reaktion mehrfach positiv geladener Vorläuferionen mit Elektronen zu alternativen Spaltprodukten innerhalb des Peptidrückgrates und somit zur Bildung von c- und z-Ionen (vgl. Abb. 11), wodurch auch hier komplementäre Ionenserien generiert werden.



**Abb. 11: Fragmentierungsschema am Beispiel eines linearen Tripeptides**

Dargestellt sind mögliche Dissoziationen innerhalb des Peptidrückgrates. Die Nomenklatur erfolgt nach Roepstorff und Fohlman (175). Sequentielle Ionenserien sind blau und rot markiert.

ETD hat sich hinsichtlich der Analyse intakter, nicht kovalent verbundener Proteinkomplexe als vorteilhaft gegenüber CID herausgestellt (176). Bei HCD handelt es sich um eine höherenergetische Fragmentierungstechnik als CID (auch als „*beam-type* CID“ bezeichnet (177)), die ergänzende Fragmentationen besonders im niedrigen  $m/z$ -Bereich liefert, auch wenn prinzipiell, wie bei CID, vorrangig die Peptidbindung gespalten wird. Diese Technik ist auf Orbitrap-Instrumente limitiert und wurde dort erstmals in der *C-trap* durchgeführt, die normalerweise dazu dient, Ionen auf dem Weg in den Orbitrap-Analysator kurzzeitig zu lagern und nachzubeschleunigen (178). Obwohl theoretisch möglich, bilden die meisten Aminosäuren keine  $b_1$ -Ionen, da die Bildung in der Gasphase energetisch ungünstig ist (179). Aminosäuren können sogenannte Immoniumionen freigegeben, die im niedrigen  $m/z$ -Bereich auftreten und ein direkter Hinweis auf die Existenz dieser innerhalb eines Peptides sind (180). Durch die statistische Verteilung entstehender Fragmentationen entstehen bei CID sogenannte b- und y-Ionenserien. Massenunterschiede darin sind durch den Verlust jeweils einer Aminosäure zu erklären (181-183). Da die Massen der Aminosäuren bekannt sind, kann durch die Aufklärung der Massendifferenzen der komplementären Ionenserien innerhalb eines Fragmentspektrums idealerweise direkt die Aminosäuresequenz des Peptides bestimmt werden. Diese Art der Spektreninterpretation wird auch als *de novo*-Sequenzierung bezeichnet und ist auch ohne den Einsatz von Software möglich, aber sehr zeitaufwändig (184). Erschwerend kommt hinzu,

dass neben den erwarteten Ionenserien auch Seitenkettenfragmentierungen und interne Fragmente auftreten können. Da überdies nur in seltenen Fällen vollständige Ionenserien generiert werden, erfolgt bei der Sequenzierung von Peptiden zumeist ein anschließender Abgleich mit Proteindatenbanken (185). Dies kann nach erfolgter *de novo*-Sequenzierung geschehen oder als eigenständige Methode: Durch Abgleich der beobachteten Fragmentspektren mit *in silico* erzeugten Fragmentspektren massengleicher Peptide lässt sich eine probabilistische Aussage darüber treffen, ob die zugeordnete Peptidsequenz korrekt ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass die zugeordnete Peptidsequenz korrekt ist, wird über einen Score ausgedrückt, in den verschiedenste Faktoren wie die Anzahl nicht zugeordneter Fragmentationen einfließen. Die exakte Berechnung dessen ist für die verschiedenen Programme verschieden. Meist geschieht dies zusätzlich durch eine parallele Suche gegen eine *decoy*-Datenbank, in der Sequenzen nicht existierender Proteine gespeichert sind (186). Durch Vergleich der Peptide, die als Bestandteil der *decoy*-Datenbank gefunden wurden, mit denen, die gegen die reale Datenbank identifiziert wurden, kann ein Quotient bestimmt werden, der als *false discovery rate (FDR)* bezeichnet wird. Dieser stellt eine verschiebbare Grenze dar zwischen vielen Treffern und hochwertigen Treffern (187). Je niedriger er gewählt wird, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass identifizierte Peptide korrekt sind, auch wenn das bedeuten kann, dass weitere korrekte Treffer nicht mehr berücksichtigt werden.

Beginnend mit der Einführung der 2D-Gelelektrophorese 1975 durch O'Farrell (188) wurden Experimente durchgeführt, die sich mit dem Term Proteomics bezeichnen lassen. Heutzutage versteht man unter Proteomicsexperimenten „nicht nur die Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen, sondern auch die Bestimmung von deren Lokalisierung, Modifikationen, Interaktionen, Aktivitäten, und deren Funktion“ (189). In modernen Proteomicsexperimenten, in denen mittels MS während einer Messung tausende von Proteinen innerhalb einer Probe identifiziert werden können (190), wird meist eine *FDR* von 1 % gewählt (148,191,192).

### 1.3.2 Identifizierung posttranslational modifizierter Peptide

Bei PTMs von Proteinen handelt es sich um kovalente Modifikationen einzelner Aminosäuren oder auch Spaltungen innerhalb von Proteinen, die nach der Translation *in vivo* stattfinden. Diese finden oft innerhalb der Zelle statt, können enzymatisch oder nichtenzymatisch entstehen und werden in den meisten Fällen vom Organismus selbst reguliert. Erst durch PTMs erhalten Proteine oftmals die gewünschte Struktur und somit auch Funktion. Darüber

hinaus wird auch die Aktivität von Proteinen reguliert (193). Die Liste der in der Natur beobachteten PTMs umfasst hunderte möglicher Modifikationen (194,195). Zu den häufigsten zählen das Verknüpfen mit Zuckern (Glykosylierung), Phosphatresten (Phosphorylierung), die Methylierung, Acylierungen sowie die Acetylierung bestimmter Aminosäuren (196). Ein weiteres Beispiel ist Cystein, dessen Thiolgruppe *in vivo* mit der Thiol-Gruppe einer anderen Cysteinseitenkette desselben Proteins eine kovalente Bindung ausbilden kann, wodurch eine Disulfidbrücke ausgebildet wird, die die Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen erheblich beeinflusst. Vor der massenspektrometrischen Untersuchung werden disulfidverbrückte Proteine *in vitro* reduziert und alkyliert, sodass die Disulfidbrücke aufgebrochen wird und stattdessen alle Cysteinseitenketten irreversibel carbamidomethyliert werden (197). *In vitro* eingefügte Modifikationen von Aminosäuren werden streng genommen nicht als PTMs bezeichnet. Eine weitere häufig beobachtete Modifikation, die im Zuge der Probenvorbereitung auftreten kann, ist die nicht-enzymatisch induzierte Deamidierung von Asparagin und Glutamin zu Asparaginsäure und Glutaminsäure (198).

Peptide, die an einer oder mehreren Aminosäuren kovalent modifiziert sind, sind in normalen LC-MS-Experimenten durch einen anschließenden Abgleich mit einer Datenbank, wie in Kap. 1.3.1 beschrieben, nicht zu identifizieren, sofern die PTM nicht in den Suchalgorithmus implementiert wurde, da die Modifikationen zu einer Veränderung der Masse führen (199). Nichtsdestotrotz sind moderne LC-MS-Strategien die beste Wahl zur Identifizierung posttranslational modifizierter Peptide, da im Gegensatz zu konventionellen, zeitintensiven Methoden wie Radiomarkierungen innerhalb von Stunden hunderte PTMs identifiziert werden können. Eine rein datenbankgestützte Identifizierung solcher Peptide ist mit einem erheblichen Rechenaufwand verbunden, während der Rechenaufwand von *de novo*-Algorithmen nicht signifikant erhöht wird (200,201). Der Mehraufwand bei der datenbankgestützten Analyse rührt daher, dass bei der Berücksichtigung von z.B. nur einer variablen Modifikation einer Aminosäure in Abhängigkeit von deren Abundanz eine Vielzahl möglicher Kombinationen entsteht, die berücksichtigt werden müssen. Durch den Einsatz von Algorithmen hingegen, die basierend auf *de novo*-Sequenzierungen sowie kombinierter Datenbanksuche Kandidaten ermitteln, ist es möglich, auch ungerichtet nach modifizierten Peptiden sowie Aminosäureaustauschen (Blind-PTM-Suche) zu suchen (202). Eine solche Identifizierungsstrategie verwendet die in der vorliegenden Arbeit verwendete Software PEAKS zur Peptididentifizierung (203). Auf instrumenteller Seite wurde gezeigt, dass der Einsatz von ETD als Fragmentierungstechnik hinsichtlich der Identifizierung phosphorylierter Peptide komplementäre Er-

gebnisse zu CID liefert, was die Anzahl identifizierter Peptide betrifft (204). Da labile PTMs wie Phosphorylierungen, Sulfonierungen und besonders Glykosilierungen im Zuge von CID oftmals als Neutralverlust abgespalten werden, ist eine exakte Lokalisierung durch Analyse des Fragmentspektrums nicht möglich. Wird ETD als Fragmentierungsmethode gewählt, bleiben die erwähnten Modifikationen erhalten. Durch die Analyse der Ionenserien kann so ihre exakte Position im Peptid bestimmt werden.

### 1.3.3 Quervernetzte Peptide und deren massenspektrometrische Identifizierung

Proteine können nicht nur dahingehend modifiziert werden, dass einzelne Aminosäuren kovalent mit einem anderem Molekül verknüpft werden, sondern auch so, dass zwei Aminosäuren nicht nur durch die Peptidbindung, sondern zusätzlich über die Seitenketten mit anderen Aminosäuren verbunden sind. Hierbei spricht man von quervernetzten Peptiden (engl. *cross-linking*). Diese können *in vivo* als PTMs auftreten oder auch zielgerichtet *in vitro* eingefügt werden. Nativ auftretende Quervernetzungen einzelner Aminosäuren finden ausschließlich bei Aminosäuren statt, deren Seitenketten spezifische funktionelle Gruppen tragen. Als Beispiel seien die Thiol-Funktion des Cysteins bei Disulfidbrücken oder auch die Hydroxyfunktion von Tyrosin genannt (205,206). Die Aminofunktion, die u.a. am C $\epsilon$ -Atom von Lysinresten zu finden ist, ist eine weitere wichtige funktionelle Gruppe, die oft, wie bei Elastin und Kollagen auch, in Quervernetzungen involviert ist (207). Quervernetzungen zwischen zwei Aminosäuren lassen sich überdies auch *in vitro* generieren. Chemische Quervernetzung kann zum Zweck haben, Bindungspartner zu identifizieren oder niedrig aufgelöste strukturelle Daten über Proteine und Proteinkomplexe zu erhalten, die nicht mittels gängiger Methoden zur Strukturuntersuchung gewonnen werden können (208). Durch den Einsatz z.B. aminreaktiver, bifunktionaler Quervernetzer, die räumlich benachbarte Lysinreste eines löslichen Proteins verknüpfen, können Abstandsinformationen über diese gewonnen werden. Nach der massenspektrometrischen Analyse („*bottom-up*“-Strategien) lassen sich die neu entstandenen bifunktional vernetzten Peptide mittels spezieller Algorithmen sequenzieren (209-212). Die Kombination dieser Daten mit molekularer Modellierung erlaubt die Generierung niedrig aufgelöster dreidimensionaler Strukturen des Proteins (213). Diese analytische Methode wird auch als MS3D bezeichnet (214).

Eine große Herausforderung stellt nach wie vor die Identifizierung und Sequenzierung quervernetzter Peptide dar, da diese zunächst von linearen Peptiden unterschieden werden

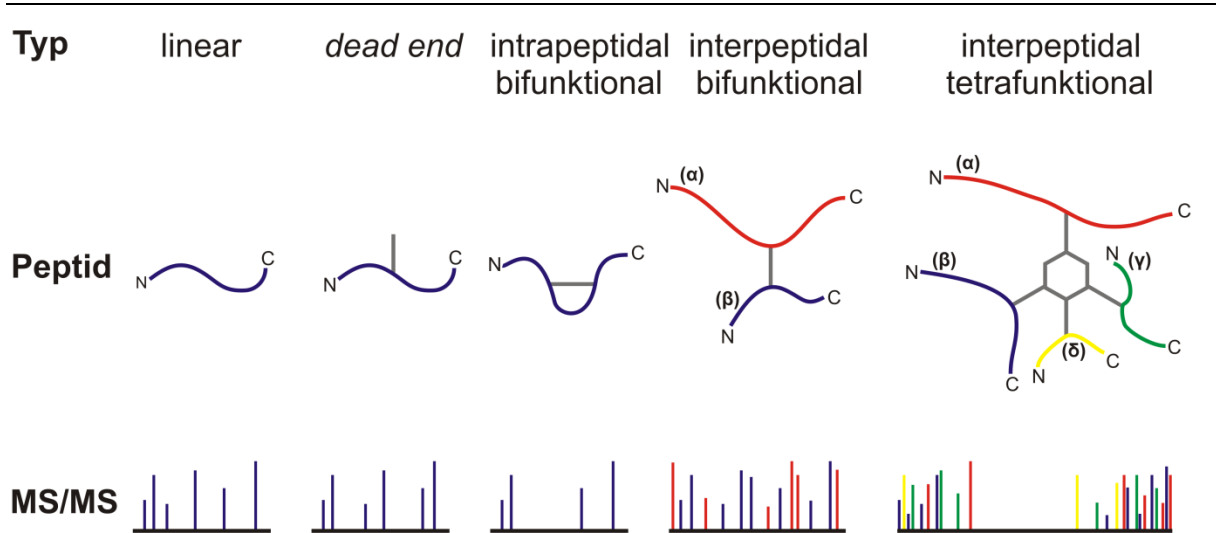
müssen und die hypothetische Anzahl möglicher Quervernetzungskombinationen die der linearen Peptide um ein Vielfaches überschreitet. So wird die Suche nach quervernetzten Peptiden auch als die Suche nach „der Nadel im Heuhaufen“ bezeichnet (215). Durch den Einsatz von isotope markierten oder CID-spaltbaren Quervernetzern wird die Identifizierung solcher *in vitro* quervernetzten Peptide erleichtert (216,217). Bei MS3D-Experimenten kommen spezifisch schneidende Proteasen wie z.B. Trypsin zum Einsatz, wodurch die kombinatorischen Möglichkeiten entstehender Peptide weiter reduziert werden (218). Da tryptische Peptide immer einen positiv geladenen C-Terminus haben (219) und interpeptidal quervernetzte Peptide im Gegensatz zu linearen mindestens zwei C-Termini besitzen, ist darüber hinaus eine Anreicherung durch starke Kationenaustauschchromatographie (engl. *strong cation exchange*, SCX) möglich (220). Auch die isotopenkodierte Markierung von typischen aminreaktiven Quervernetzern wie Bis(Sulfosuccinimidyl)suberat (BS3) und Disuccinimidylsuberat (DSS) ist in MS3D-Experimenten üblich, um diese schon im Vorläuferionenspektrum als Signaldupletts mit einem spezifischen Massenunterschied zu detektieren.

Auf intrinsisch quervernetzte Peptide, zu denen auch Elastinpeptide zählen, sind diese Methoden nicht anwendbar, da die Quervernetzungen bereits bestehen und eine nachträgliche, spezifische Modifikation der diversen Quervernetzungsaminoaciden in Elastin nicht möglich ist. Die in Elastin vorrangig vorhandenen Peptidtypen, die durch die Quervernetzung entstehen können, und auf deren Vorhandensein enzymatisch hydrolysiertes Elastin in dieser Arbeit hin untersucht wurde, sind in Abb. 12 gezeigt.

Als *dead end*-Typ kann im Falle von Elastin freies Allysine bezeichnet werden, das nicht mit anderen Lysinen oder Allysinen reagiert hat. Zu berücksichtigen ist, dass entstehende Fragmentspektren eine Mischung verschiedener Ionenserien basierend auf den unterschiedlichen Peptidketten sind (vgl. Abb. 12). Die Sequenzierung wird im Falle von Elastinpeptiden zusätzlich dadurch erschwert, dass Elastin nicht mittels spezifisch spaltender Proteasen hydrolysiert werden kann. Dies verhindert überdies eine Anreicherung von quervernetzten Peptiden via SCX, da am C-Terminus nicht zwingend eine positiv geladene Aminosäure vorhanden sein muss. Auf methodischer Ebene bestehen derzeit keine Protokolle, um intrinsisch quervernetzte Peptide aus Elastin anzureichern oder massenspektrometrisch eindeutig zu charakterisieren. Bestehende Algorithmen zur Identifizierung von quervernetzten Peptiden sind meist auf die Sequenzierung bifunktionaler Peptide reduziert (221). Die in dieser Arbeitsgruppe kürzlich entwickelte Software PolyLinX ist jedoch dazu in der Lage, auch Peptide mit den für Elastin typischen Quervernetzungen zu identifizieren.



## Theoretischer Hintergrund



**Abb. 12: In proteolytischen Elastinverdauen vorkommende Peptidkomponenten und deren Nomenklatur**  
Die der jeweilige Peptidkette zugehörigen Fragmentationen sind im Tandem-MS-Fragmentspektrum entsprechend farbig markiert. Während lineare, *dead end*, und interpeptidal bifunktional quervernetzte Peptide Fragmentationen über den gesamten Massenbereich verteilt zeigen, sind die *in silico* erzeugten Fragmentationen bei intrapeptidal und tetrafunktional quervernetzten Peptiden anders verteilt und zeigen im mittleren Massenbereich weniger Fragmentationen. Dies rührt daher, dass der statistische Bruch einer Peptidbindung nicht zu der Bildung von Fragmenten mittleren Gewichtes aufgrund der vorhandenen Quervernetzung führt. Die Nomenklatur erfolgt nach Schilling *et al.* (222).

Das Programm ist derzeit jedoch auf die Analyse einfach geladener Ionen aus MALDI-TOF/TOF-Daten limitiert (223). Als Trainingsdaten zur Erstellung der Software dienten synthetisch hergestellte Allysine-enthaltende Peptide, die *in vitro* spontan elastintypische Quervernetzungen ausbildeten.

## 2 Zielstellung

Obwohl Elastin neben Kollagen eines der abundantesten Proteine bei Wirbeltieren ist, ist über dessen Aufbau auf molekularer Ebene wenig bekannt. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass Elastin extrem hydrophob und als unlösliches Biopolymer mit einer radiergummiartigen Konsistenz gängigen analytischen Methoden zur strukturellen Aufklärung nicht zugänglich ist. Unabhängig davon hat sich die Massenspektrometrie einhergehend mit neuen instrumentellen Entwicklungen in den letzten Jahren weiterentwickelt, so dass sie es nun erlaubt, auch strukturelle Informationen über solche „Problempoteine“ gewinnen zu können. Durch proteolytische Verdauung gewonnene Proteinfragmente lassen durch die Identifizierung mithilfe von hochauflösender MS Rückschlüsse auf die Struktur zu.

Die vorliegende Arbeit hatte zunächst zum Ziel, auf informatischer, biochemischer und instrumenteller Seite Methoden zu entwickeln, die es erlauben, strukturelle Informationen über elastinähnliche Biomaterialien und Elastin gewinnen zu können und diese zu analysieren. Weiterhin sollte die zum Abbau von nativem Elastin verwendete Protease PE hinsichtlich der Spaltspezifität näher charakterisiert werden. Da durch den proteolytischen Verdau neben den quervernetzten Peptiden auch eine Vielzahl linearer Peptide freigesetzt wird, stand es im Fokus, diese so gut es geht unterscheiden zu können.

Hierbei war es ein konkretes Ziel, massenspektrometrische Methoden zu entwickeln, die es ermöglichen, die für Elastin einzigartigen tetrafunktional quervernetzten Peptide sowie auch bifunktional quervernetzte Peptide in Elastin zu identifizieren.

Mithilfe der entwickelten Methoden sollten Informationen über intra- und interpeptidale quervernetzte Domänen gewonnen werden, die einen direkten Einblick in die Vernetzung der unterschiedlichen TE-Monomere bieten. Zwar ist hinreichend bekannt, welche Aminosäuren als Quervernetzer dienen, und auch, wo sich diese in der TE-Sequenz befinden, allerdings ist komplett unbekannt, welche Domänen mit welchen verbunden werden und in welchem Maße dies geschieht. Als Substrat diente reines, intaktes Elastin von Säugetieren und Amphibien. Somit hatte diese Arbeit als übergeordnetes Ziel, mittels MS das Quervernetzungsmuster von Elastin phylogenetisch nah und fern verwandter Organismen zu entschlüsseln. Dieses würde es erstmals erlauben, eine Aussage darüber zu treffen, wie reifes Elastin auf molekularer Ebene aufgebaut ist, in welchem Maß die TE-Sequenz darauf Einfluss hat und inwiefern dies wiederum die physikochemischen Eigenschaften von Elastin prägt.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien

$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymzimtsäure	CHCA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Aceton		VWR Prolabo, Leuven, Belgien
Acetonitril	ACN	VWR Prolabo, Leuven, Belgien
Acetylchlorid		Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ameisensäure	FA	Merck, Darmstadt
Ammoniak	NH <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe
Ammoniumhydrogencarbonat	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Borsäure		Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Butanol	BuOH	VWR Prolabo, Leuven, Belgien
Chloroform	CHCl <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe
Cyanogenbromid	CNBr	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
2,5-Dihydroxybenzoesäure	DHB	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Diethylether		VWR Prolabo, Leuven, Belgien
Dithiothreitol	DTT	AppliChem, Chicago, IL, USA
Ethanol	EtOH	VWR Prolabo, Leuven, Belgien
Fluorenylmethoxycarbonylchlorid	FMOC-Cl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Harnstoff		Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Iodacetamid	IAA	AppliChem, Chicago, IL, USA
2-Mercaptoethanol		Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol	MeOH	VWR Prolabo, Leuven, Belgien
Natriumchlorid	NaCl	Promega GmbH, Madison, USA
Natronlauge	NaOH	Roth, Karlsruhe
1-Propanol		Roth, Karlsruhe
2-Propanol		VWR Prolabo, Leuven, Belgien
Propionsäureanhydrid	Pr	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
N-Propylchlorformiat	PrCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pyridin		Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Salzsäure	HCl	Grüssing, Filsum

## Material und Methoden

---

Sinapinsäure	SA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trifluoressigsäure	TFA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris-Aminomethan	TRIS	Merck, Darmstadt

### 3.1.2 Laufmittel, Lösungen und Puffer

#### 3.1.2.1 Derivatisierungen

Propionylierungsreagenz 1	0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat
Propionylierungsreagenz 2	9 % (v/v) NH <sub>4</sub> OH / 23 % (v/v) Propionsäureanhydrid / 68 % (v/v) 2-Propanol
Butanoylierungsreagenz	20 % (v/v) Acetylchlorid / 80 % (v/v) BuOH
FMOC-Reagenz 1	0,1 M Borsäure; pH 8
FMOC-Reagenz 2	12 mM FMOC-Cl in ACN
Propylchlorformiatreagenz 1	0,1 M Borsäure; pH 8,5
Propylchlorformiatreagenz 1	50 % (v/v) 1-Propanol / 50 % (v/v) Pyridin

#### 3.1.2.2 Chromatographie und Massenspektrometrie

MS-Lösung 1	50 % (v/v) ACN / 0,1 % (v/v) FA in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Laufmittel RP A	0,1 % (v/v) FA in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Laufmittel RP B	80 % (v/v) ACN / 0,1 % (v/v) FA in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Waschlösung 1	2 % (v/v) ACN / 0,1 % (v/v) FA in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Laufmittel DES-L	2,5 % (v/v) MeOH / 0,1 % (v/v) FA in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Laufmittel SCX A	20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / 10 % (v/v) ACN in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> ; pH 3
Laufmittel SCX B	20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / 10 % (v/v) ACN / 1 M KCl in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> ; pH 3
CHCA-Matrix 1	10 mg mL <sup>-1</sup> CHCA in ACN / H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> 1:1, (v/v) / 0,1 % TFA
CHCA-Matrix 2	5 mg mL <sup>-1</sup> CHCA in ACN / H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> 1:1, (v/v) / 0,1 % TFA
SA-Matrix	10 mg mL <sup>-1</sup> SA in ACN / H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> 1:1, (v/v) / 0,1 % TFA

#### 3.1.2.3 Enzymatische Verdaue

Elastasepuffer	50 mM Tris-HCl in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> ; pH 8,5
Trypsinpuffer	50 mM Tris-HCl in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> ; pH 8,0

Chymotrypsinpuffer	50 mM Tris-HCl in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> ; pH 7,5
<i>Nepenthes</i> -Puffer	100 mM Glycin-HCl in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> ; pH 2,5

### 3.1.2.4 Elastinisolation

CNBr-Reagenz	10 % (v/v) CNBr in FA
Chaotropes Reagenz	300 mM TRIS / 4 M Harnstoff / 1,5 M Mercaptoethanol in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Trypsin-Reagenz	Trypsin (ca. 6000 U mL <sup>-1</sup> ) in 100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

0,5 mL- und 1,5 mL-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
10 µl, 100 µl und 1000 µl Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
ZipTip-Pipettenspitzen (C18 und SCX)	MerckMillipore, Darmstadt
2 mL Reaktionsgefäße	Roth, Karlsruhe
Zentrifugenfilter VivaSpin 500 MWCO 5000	Sartorius AG, Göttingen

### 3.1.4 Enzyme, Proteine, Peptide und Aminosäuren

<i>Aspergillus nidulans</i> Aminoxidase (ANAO)	Dr. Arjen Sein, DSM Biotechnology Center, Delft, Niederlande
Tropoelastin (TE), IF 2	Prof. Markus Pietzsch, Institut für Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg
<i>Nepenthes</i> -Rohextrakt	Dr. David Schriemer, University of Calgary, Ka- nada, isoliert entsprechend Rey <i>et al.</i> (224) <i>N. rafflesiana</i> , <i>N. ampularia</i> , <i>N. mirabilis</i> , <i>N. glo- bosa</i>
Peptid GAKPP-Aad-IG	Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immuno- logie, Halle
Peptid GKPP-Aad-PGLG	Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immuno- logie, Halle
Desmosin (DES), ≥ 99,5 %	Elastin Products Company, Owensville, MO, USA

Isodesmosin (IDES), $\geq 99,5 \%$	Elastin Products Company, Owensville, MO, USA
Pankreaselastase (PE), <i>Sus scrofa</i>	Elastin Products Company, Owensville, MO, USA
Chymotrypsin, <i>sequencing grade</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
Lysinonorleucin (LNL), $\geq 99,5 \%$	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
Trypsin, <i>sequencing grade</i>	Sigma Aldrich, Steinheim

### 3.1.5 Gewebeproben

Die Arbeit mit humanem Gewebe erfolgte unter Bewilligung des Ethikkomitees der Medizinischen Fakultät (Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg) unter den Auflagen der Ethikdeklaration von Helsinki.

#### 3.1.5.1 Humanes Gewebe (*Homo sapiens*, HSA)

Humanes Aortengewebe stammte aus einer Bypass-Operation und wurde von Prof. Ulrich Stock (Goethe-Universität, Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Die in dieser Arbeit auf Quervernetzungen untersuchte Probe stammte von folgendem Patienten:

AE 168                                      69 Jahre, männlich

#### 3.1.5.2 Bovines Gewebe (*Bos taurus*, BTA)

Bovines Aortengewebe und andere größere Blutgefäße wurden von dem Schlachthof „Christian Hahn“ in Otterwisch von einer frisch geschlachteten, adulten Milchkuh (ca. 3 Jahre alt) der Rasse *Fleckvieh* bezogen.

#### 3.1.5.3 Gewebe vom tropischen Krallenfrosch (*Xenopus tropicalis*, XTR)

Adulte Frösche (ca. 2 Jahre alt) der Art XTR wurden von Dr. Anna Noble (University of Portsmouth, UK) bezogen. Die Frösche wurden zuvor durch eine angelegte Hochspannung am Gehirn getötet, sodass das Elastin der Lunge und der größeren Blutgefäße keinen Schaden nahm.

#### 3.1.5.4 Mausgewebe (*Mus musculus*)

Adulte Hausmäuse wurden aus der Zoofachhandlung „Fressnapf“ bezogen und waren bereits tot und tiefgefroren.

Das Elastin der entsprechenden Gewebetypen wurde wie in Kap. 3.2.2 beschrieben isoliert und aufgereinigt.

### 3.1.6 Laborgeräte

Vakuumkonzentrator Savant SPD1010	Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen
Vakuumkonzentrator Plus	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage AG 204	Mettler Toledo, Columbus, OH, USA
Feinwaage XA105	Mettler Toledo, Columbus, OH, USA
Fraktionensammler II	Waters, Manchester, Großbritannien
Magnetrührer MR1000	Heidolph, Schwabach
pH-Meter	Mettler Toledo, Columbus, OH, USA
Pipetten (2,5 µL, 10 µL, 100 µL und 1 mL)	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank Hera Safe	Heraeus, Hanau
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischrüttler REAX top	Heidolph, Schwabach
Trockenschrank UM400	Memmert, Schwabach
Zentrifuge miniSpin	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Spectrafuge	neoLab, Heidelberg

### 3.1.7 Chromatographie

HPLC 1100 series	Agilent, Waldbronn
NanoHPLC Ultimate 3000nano	Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen
NanoHPLC Ultimate 3000 RSLCnano	Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen
EASY-nLC II	Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen
Trennsäule Reprosil-Pur 120 C18, 3 µm, 2 mm x 150 mm	Dr.Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen
Vorsäule Acclaim PepMap C18, 5 µm, 100 Å, 300 µm x 5 mm	Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen
Trennsäule Acclaim PepMap	Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen

C18, 3  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 75  $\mu\text{m}$  x 150 mm

Trennsäule Acclaim PepMap RSLC  
C18, 2  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 75  $\mu\text{m}$  x 150 mm

Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen

Trennsäule EASY column SC200  
C18, 3  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 75  $\mu\text{m}$  x 100 mm

Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen

### 3.1.8 Massenspektrometer

4800 MALDI-TOF/TOF

Sciex, Darmstadt

ESI-LCQ Ion Trap

Finnigan (jetzt: Thermo Fisher Scientific Inc.), Bremen

NanoESI-Q-TOF-2

Waters, Manchester, Großbritannien

NanoESI-LTQ-Orbitrap Velos Pro

Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen

NanoESI-Orbitrap Fusion Tribrid

Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen

### 3.1.9 Datenverarbeitung

#### 3.1.9.1 Datenakquisition

ChemStation V. 03.0B

Agilent, Santa Clara, CA, USA

Chromeleon V. 6.80

Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen

MassLynx V. 4.1

Waters, Manchester, Großbritannien

Xcalibur V. 2.0.7

Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen

#### 3.1.9.2 Datenprozessierung und Peptidentifizierung

DESGET V. 0.4.7

Christoph Schröder / Christian Schmelzer

Mascot Distiller V. 2.5.1.0

Matrix Science, Boston, MA, USA

PEAKS V. 6.0 – 7.5

Bioinformatics Solutions, Waterloo, ON,  
Kanada

PolyLinX V. 1.0

Christoph Ruttkies

StavroX V. 3.4.9-3.4.12

Michael Götze, MLU Halle-Wittenberg



### 3.1.9.3 Datenvisualisierung

Data Explorer V. 3.70	Sciex, Darmstadt
MZmine V. 2.1.3	Tomáš Pluskal, Okinawa Institute, Japan
RawMeat V. 2.0	Vast Scientific, <a href="http://www.vastscientific.com">www.vastscientific.com</a>
VMD V. 1.9.2	University of Illinois, IL, USA

### 3.1.9.4 Fragmentationenberechnung

GPMAW V. 6.00	Lighthouse Data, Odense, Dänemark
ProteinProspector (MS-COMP) V. 5.14.2	University of California, San Francisco, CA, USA
XLinkFragmenter	Christoph Ruttkies

### 3.1.9.5 Moleküldynamiksimulationen

GROMACS V. 4.6 beta	Science for Life Laboratory, Stockholm, Schweden
GOLD V. 5.2	Cambridge Crystallographic Data Center, Cambridge, Großbritannien
AMBER V. 13	<a href="http://ambermd.org">ambermd.org</a> , Peter Kollman, UCSF, CA, USA
MOE V. 2012.10	Chemical Computing Group, Montreal, Kanada

## 3.2 Biochemische Methoden

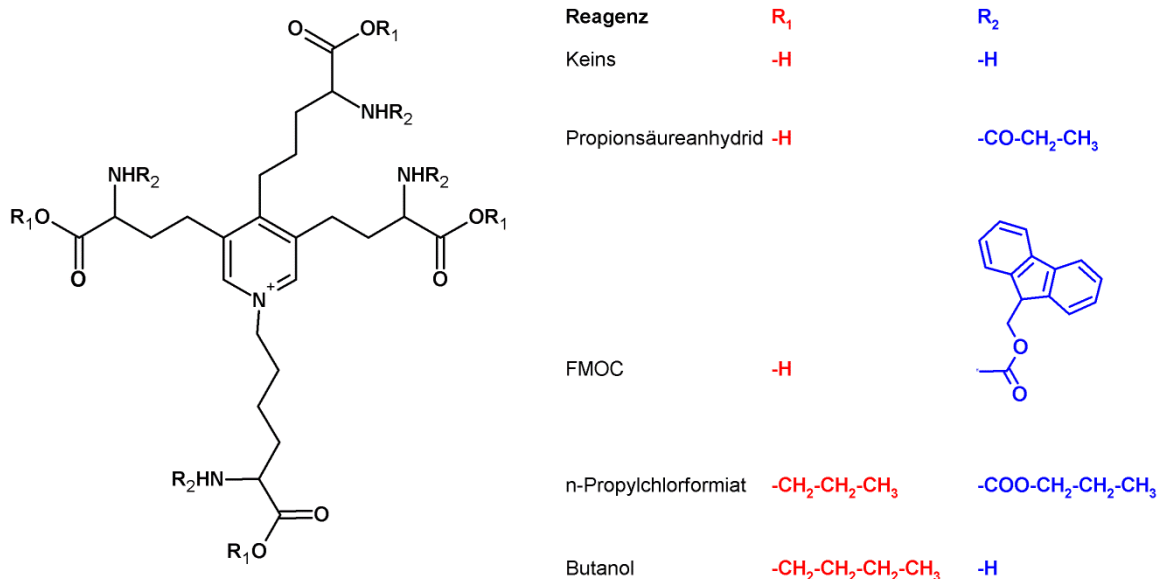
### 3.2.1 Derivatisierung von Desmosin und Isodesmosin

DES/IDES-Standards wurden jeweils mit BuOH, FMOC-Cl, n-Propylchlorformiat (PrCl) und Propionsäureanhydrid (Pr) derivatisiert (225,226). Eine Übersicht der modifizierten funktionellen Gruppen durch die vier Reagenzien am Beispiel von DES ist in Abb. 13 dargestellt.

#### 3.2.1.1 Propionylierung

Zur N-terminalen Propionylierung wurde der entsprechende Standard (50 µg) mit 50 µL Propionylierungsreagenz 1 sowie mit 50 µL Propionylierungsreagenz 2 versetzt und für 30 s schüttelnd durchmischt. Anschließend wurde der Ansatz 1 h bei Raumtemperatur (RT) inku-

biert und am Vakuumkonzentrator bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 50  $\mu\text{L}$  MS-Lösung 1 aufgenommen und bis zur Analyse bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.



**Abb. 13: Strukturformeln der derivatisierten DES-Standards**  
Modifiziert nach Schröder *et al.*(227).

### 3.2.1.2 Butanoylierung

Zur C-terminalen Butanoylierung wurde der entsprechende Standard (50  $\mu\text{g}$ ) mit 200  $\mu\text{L}$  Butanoylierungsreagenz versetzt und für 30 s schüttelnd durchmischt. Anschließend wurde der Ansatz für 1 h bei  $70\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert und am Vakuumkonzentrator bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 50  $\mu\text{L}$  MS-Lösung 1 aufgenommen und bis zur Analyse bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.2.1.3 Derivatisierung durch FMOC-Cl

Zur N-terminalen Derivatisierung durch FMOC wurde der entsprechende Standard (50  $\mu\text{g}$ ) mit 100  $\mu\text{L}$  FMOC-Reagenz 1 sowie mit 100  $\mu\text{L}$  FMOC-Reagenz 2 versetzt und für 30 s schüttelnd durchmischt. Anschließend wurde der Ansatz 1 h bei RT inkubiert und am Vakuumkonzentrator bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 50  $\mu\text{L}$  MS-Lösung 1 aufgenommen und bis zur Analyse bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.2.1.4 Derivatisierung durch n-Propylchlorformiat

Zur N- und C-terminalen Derivatisierung durch n-Propylchlorformiat wurde der entsprechende Standard (20 µg) zunächst mit 80 µL Propylchlorformiat-Reagenz 1 sowie mit 40 µL Propylchlorformiat-Reagenz 2 versetzt und schüttelnd durchmischt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 µL PrCl. Der Ansatz wurde 1 h bei RT inkubiert und am Vakuumkonzentrator bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 50 µL MS-Lösung 1 aufgenommen und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

### 3.2.2 Isolation von Elastin aus tierischem Gewebe

Aortengewebe wurde mit dem Skalpell zunächst in 5 mm - 10 mm große Stücke zerteilt und anschließend in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt. Im Fall der Froschlunge wurden beide Lungenlappen (ca. 4 mm lang) in ein Reaktionsgefäß gegeben. Die Isolation von Elastin wurde entsprechend dem in Schmelzer *et al.* beschriebenen Protokoll durchgeführt (98). Sie erfolgte innerhalb von fünf Tagen und erforderte die schrittweise Extraktion unerwünschter Bestandteile mittels unterschiedlicher Lösungsmittel und Lösungen. Das Gewebe verblieb während der gesamten Isolation in dem Reaktionsgefäß, das jeweils mit 1,5 mL des entsprechenden Reagenzes versetzt wurde. Während des jeweiligen Extraktionsschrittes wurde das Reaktionsgefäß horizontal gelagert schüttelnd bei RT inkubiert. Nach jedem Extraktionsschritt wurde das Gewebestück für 5 min bei 14.000 x g zentrifugiert, die vorherige Extraktionslösung abgenommen und mit der neuen Lösung auf 1,5 mL aufgefüllt.

Zunächst wurde die Probe zweifach mit 1 M NaCl-Lösung für jeweils 2 h gewaschen. Als nachfolgender Schritt erfolgte die Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> / EtOH im Verhältnis 1:1 (v/v) und der Ansatz wurde über Nacht inkubiert. An Tag 2 erfolgte die Entfernung lipophiler Bestandteile durch Zugabe organischer Lösungsmittel. In chronologischer Reihenfolge wurden EtOH, Chloroform/MeOH (1:1 (v/v)), Diethylether und Aceton zugegeben und jeweils 1 h inkubiert. Die erneute Zugabe von EtOH für 1 h diente als Waschschrift zur Entfernung dieser. Als letzter Extraktionsschritt an Tag 2 diente die Zugabe von CNBr-Reagenz, das die Peptidbindung C-terminal zu Methionin hydrolysiert und dadurch methioninenthaltende Proteine der EZM entfernt. Die Inkubation erfolgte über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurde dieser Schritt wiederholt und für weitere 6 h inkubiert. Zur vollständigen Entfernung des Reagenzes und der gespaltenen Proteine wurde anschließend für 10 min mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> / EtOH im Verhältnis 1:1 (v/v) gewaschen. Dieser Schritt wurde anschließend zweimal wiederholt. Die folgende Zugabe von

chaotropem Reagenz diente der Denaturierung noch vorhandener unerwünschter Proteine wie Kollagen. Dieser Schritt wurde über Nacht ausgeführt und am Morgen von Tag 4 zweimal für je 3 h wiederholt. Zur Entfernung des chaotropen Reagenzes wurde zunächst zweimal mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  / EtOH im Verhältnis 1:1 (v/v) sowie anschließend mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  für je 10 min gewaschen. Als letzter Schritt an Tag 4 diente die Zugabe von Trypsin-Reagenz, das zum Ziel hatte, noch vorhandenes Kollagen enzymatisch zu hydrolysieren. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde an Tag 5 zunächst erneut chaotropes Reagenz gegeben und dieses nach einer Inkubationszeit von 1 h durch ACN /  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  (1:1 (v/v)) entfernt. Dieser Schritt wurde anschließend wiederholt. Anschließend wurde durch Zugabe von EtOH/ $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  in den Verhältnissen 1:1, 7:3, 95:5 (v/v) und zuletzt reinem EtOH das isolierte Elastin ein letztes Mal gewaschen. Bei geöffnetem Deckel wurde das Elastin im Luftstrom getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.2.3 Totalhydrolyse zur Freisetzung von Desmosin und Isodesmosin

Das entsprechende Substrat wurde in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß vorgelegt und anschließend im Überschuss mit 6 M HCl versetzt. Die Inkubation erfolgte bei  $105\text{ }^\circ\text{C}$  für 24 h. Dabei wurde das Reaktionsgefäß fest in einem Metallbehälter eingespannt, sodass der Deckel sich durch die Verdunstung des Lösungsmittels nicht öffnete. Anschließend wurde der Rückstand im warmen  $\text{N}_2$ -Strom unter dem Abzug eingengt und in ACN /  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  1:1 (v/v) aufgenommen. Die Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.2.4 *In vitro* Quervernetzung von Tropoelastin

Lösliches TE wurde durch den Einsatz einer Aminoxidase isoliert aus *Aspergillus nidulans* (ANAO)quervernetzt wie in McGrath *et al.* beschrieben (228). Dazu wurde TE in einer Konzentration von  $10\text{ mg mL}^{-1}$  in PBS-Puffer (pH 7,4) aufgenommen und mit 1 M NaCl versetzt. Die Koazervation wurde durch Erhöhung der Temperatur auf  $37\text{ }^\circ\text{C}$  induziert. Nach Zugabe von  $1\text{ }\mu\text{M}$  ANAO erfolgte anschließend die Inkubation stehend für 20 h. Das resultierende Pellet wurde mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  und EtOH gewaschen.

### 3.2.5 Enzymatische Verdauung in Lösung

Das zu verdauende Substrat wurde in Konzentrationen von  $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$  –  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  im entsprechenden Puffer aufgenommen. Dieser wurde in Abhängigkeit davon, welche Protease eingesetzt wurde (siehe 3.1.2), gewählt. Da TE einen C-Terminus enthält, der eine Disulfidbrücke beinhaltet, wurden die Cysteinseitenketten zunächst reduziert und alkyliert. Nach erfolgter Aufnahme des Substrates in der Pufferlösung wurde zur Disulfid-Reduktion zunächst DTT in einer finalen Konzentration von  $10 \text{ mM}$  zugegeben. Der Ansatz wurde daraufhin bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  für  $10 \text{ min}$  inkubiert. Nach Abkühlung erfolgte durch Zugabe von  $40 \text{ mM}$  IAA und Inkubation im Dunkeln bei RT für  $1 \text{ h}$  die Alkylierung der reduzierten Cysteinseitenketten. Durch erneute Zugabe von  $50 \text{ mM}$  DTT wurde verbleibendes IAA inaktiviert. Anschließend erfolgte die Zugabe der entsprechenden Protease in einem Enzym-zu-Substrat-Verhältnis von  $1:20$  -  $1:200$  (w/w). Enzymatische Verdauung wurden für  $2 \text{ h}$  -  $24 \text{ h}$  bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert und durch Zugabe von TFA in einer finalen Konzentration von  $0,5 \%$  (v/v) inaktiviert. Dies entspricht einem Absenken des pH-Wertes auf  $\leq 3$ . Diente der *Nepenthes*-Rohextrakt als Protease, erfolgte keine vorherige Reduzierung und Alkylierung, da *in vivo*-Bedingungen simuliert werden sollten. Die Inaktivierung erfolgte hier durch Zugabe von verdünnter NaOH und eine daraus resultierende Erhöhung des pH-Wertes auf  $\geq 8$ .

### 3.2.6 Fraktionierung hydrophiler Peptide

Zur Fraktionierung proteolytischer Verdauung wurde eine HPLC 1100, die mit einem Fraktionensammler gekoppelt war, verwendet. Die Auftrennung erfolgte mittels RP-LC unter Verwendung eines linearen Gradienten, bestehend aus Laufmittel RP A und Laufmittel RP B bei einer Flussrate von  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$  modifiziert nach Schröder (229). Zu Beginn und zum Ende des Laufes betrug die Konzentration von RP B  $12 \%$  (v/v). Die Konzentration von RP B wurde nach der Injektion des Analyten innerhalb von  $50 \text{ min}$  auf  $40 \%$  (v/v) erhöht. Durch eine sich anschließende Erhöhung von RP B auf  $90 \%$  für  $5 \text{ min}$  -  $10 \text{ min}$  wurden hydrophobe Bestandteile von der Säule gewaschen. Die Elution der Peptide wurde UV-spektroskopisch bei einer Wellenlänge von  $214 \text{ nm}$  verfolgt. Hydrophile Fraktionen wurden innerhalb der ersten  $10 \text{ min}$  gesammelt, wobei die Fraktionierungszeit je  $1 \text{ min}$  betrug. Zur Verhinderung von Evaporation wurden die Reaktionsgefäße direkt nach Auffangen des Eluats geschlossen. Die gesammelten Fraktionen wurden am Vakuumkonzentrator bis zur Trockne eingengt und entweder in MS-Lösung 1 oder Laufmittel RP A aufgenommen. Die weitere Analyse erfolgte

entweder statisch an dem nanoESI-Orbitrap Velos Pro MS oder rechromatographisch mittels nanoHPLC-nanoESI-Orbitrap Fusion Tribrid MS.

### **3.2.7 Entsalzung enzymatischer Verdaue**

Derivatisierte DES/IDES-Standards sowie Proben mit einem hohen Salzgehalt wurden vor der massenspektrometrischen Analyse mittels ZipTip-Pipettenspitzen entsalzt und ggf. angereichert (230). Die Entsalzung wurde, wie im Handbuch beschrieben, durchgeführt. Das Eluat wurde anschließend im Vakuumkonzentrator bis zur Trockne eingengt und im Falle einer sich anschließenden statischen Messung mittels ESI oder nanoESI in MS-Lösung 1 aufgenommen. Schloss sich eine chromatographische Vortrennung zur Trennung komplexer Peptidgemische an, wurde der Rückstand in Laufmittel RP A aufgenommen.

## **3.3 Analytische Methoden**

### **3.3.1 Quantifizierung von Desmosin und Isodesmosin an der LC-ESI-LCQ Ionenfalle**

Die absolute Quantifizierung von freiem DES/IDES wurde durch *online*-Kopplung der HPLC 1100 mit einem ESI-LCQ Massenspektrometer durchgeführt. Als interner Standard diente vierfach propionyliertes DES (siehe Kap. 3.2.1;  $M^+$  750,39). Die isokratische chromatographische Trennung erfolgte mittels einer C18-Säule über 8 min bei einer Flussrate von  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$  unter Verwendung von Laufmittel DES-L. Das Injektionsvolumen betrug  $10 \text{ }\mu\text{L}$  und die Temperatur im Säulenofen betrug  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Zur massenspektrometrischen Analyse im *selected ion monitoring*-Modus wurden folgende Parameter benutzt: ionischer Positivmodus, Elektrosprayspannung  $4,5 \text{ kV}$  sowie eine Kapillartemperatur von  $220 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **3.3.2 Offline-gekoppeltes nanoLC-MALDI-TOF/TOF MS**

Die Auftrennung proteolytischer Verdaue zur *offline*-gekoppelten Analyse mittels MALDI-TOF/TOF MS erfolgte an einer Ultimate 3000 RSLCnano mit einer Flussrate von  $0,3 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$  bei einer Laufzeit von 85 min. Die Temperatur im Säulenofen betrug  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Der Analyt wurde zunächst auf eine Trapsäule geladen und dort für 9 min mit Waschlösung 1 gewaschen. Danach wurde der Analyt auf die Trennsäule geladen. Die chromatographische Auf-

trennung der Peptide erfolgte durch eine C18-Säule unter Verwendung eines Gradienten bestehend aus Laufmittel RP A und Laufmittel RP B mit dem gleichen Gradientenverlauf wie unter Kap. 3.2.6 beschrieben. Eine *online*-Überwachung der chromatographischen Trennung erfolgte durch die Messung der Absorption des UV-Signals bei 214 nm. Die HPLC war mit einem Probot-Pipettierroboter gekoppelt, der es erlaubte, das Eluat in 30 s-Intervallen direkt auf einen MALDI-384-Probenträger zu übertragen. Unmittelbar zuvor wurde das Eluat in einem T-Verbindungsstück im Verhältnis 1:2 (v/v) mit der frisch präparierten Lösung CHCA-Matrix 2 gemischt.

Nach manueller Auftragung der Kalibrierstandards, wie im Handbuch beschrieben, wurde das aufgetrennte Peptidgemisch am 4800 MALDI-TOF/TOF MS analysiert. Die Messung der Vorläuferionen erfolgte über den  $m/z$ -Bereich von 700-6000 bei einer Laserschusszahl von 1800 pro Auftragsplatz. Vorläuferionen mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis (engl. *signal-to-noise ratio*, S/N)-Wert von 50 wurden zur Tandem-massenspektrometrischen Analyse ausgewählt. Die maximale Anzahl der für Tandem-MS ausgewählten Vorläuferionen betrug 40 pro Probenpot. Natrium- und Kaliumaddukte wurden von der Tandem-MS-Analyse dynamisch ausgeschlossen. Die Fragmentierung erfolgte durch eine Kombination von LID und CID wie in Kap. 1.2.2 beschrieben. Hier betrug die maximale Anzahl an Laserschüssen 3200. Als Stop-Kriterium wurde festgelegt, dass mindestens sieben Fragmentationen einen S/N-Wert von mindestens 10 aufweisen mussten.

### 3.3.3 Statische Messungen am nanoESI-QqTOF Massenspektrometer

Statische massenspektrometrische Analysen zur Evaluation der Dissoziation von DES/IDES, deren Derivaten und Peptidstandards wurden mittels nanoESI-QqTOF MS, wie in Schröder *et al.* (227) beschrieben, durchgeführt. Die Betriebsparameter waren wie folgt: Kapillarspannung 1 kV, Konusspannung 35 V, Temperatur der Ionenquelle 80 °C. Massenspektren wurden über einen Bereich von  $m/z$  50-2500 aufgenommen. Einfach geladene Vorläuferionen von DES/IDES und deren Derivaten sowie doppelt geladene Vorläuferionen von Peptidstandards wurden ausgewählt und mittels CID Tandem-massenspektrometrisch untersucht. Hierbei wurde die Kollisionsenergie mit einer Schrittweite von 10 beginnend bei 10 eV auf 100 eV angehoben. Bei entsprechenden Peptidstandards wurde die Kollisionsenergie soweit angehoben, bis nur noch Fragmentationen von  $m/z \leq 210$  beobachtet wurden. Pseudo-MS<sup>3</sup>-Spektren wurden durch Anhebung der Konusspannung auf 110 V bis 185 V erzeugt, da die

hierdurch in der Ionenquelle erzeugten -Fragmente des Analyten anschließend für die Tandem-MS-Analyse ausgewählt wurden.

### 3.3.4 Statische Messungen am nanoESI-LTQ-Orbitrap Velos Pro Massenspektrometer

Statische Tandem-massenspektrometrische Messungen zur Analyse der Elementarzusammensetzung erzeugter DES/IDES-Produktionen sowie zur Dissoziation fraktionierter hydrophiler Peptide wurden mittels HCD-Fragmentierung an einem nanoESI-LTQ-Orbitrap Velos Pro MS durchgeführt. Die Kapillar- bzw. Sprayspannungen betragen hier 50 V und 3,5 kV. Tandem-MS-Spektren wurden bei einem Massenauflösungsvermögen  $R$  von 100.000 (bei einem  $m/z$ -Wert von 400) aufgenommen. Der analysierte  $m/z$ -Bereich betrug im MS-Modus  $m/z$  50–1500. Die Kollisionsenergien betragen zwischen 50 eV und 161 eV. Dies war davon abhängig, ob das Peptid normale Ionenserien zur Sequenzierung freigeben sollte, oder ob das Peptid vollständig dissoziiert werden sollte, um zu überprüfen, ob DES/IDES vorhanden sind (vgl. Kap. 4.2.2).

### 3.3.5 NanoLC-nanoESI-LTQ-Orbitrap Velos Pro Massenspektrometrie

Die Auftrennung proteolytischer Verdauung zur Evaluierung der Spaltspezifität von PE und *Nepenthes*-Rohextrakt wurde mit dem EASY-nLC II System durchgeführt. Die Flussrate betrug  $0,3 \mu\text{L min}^{-1}$ , wobei die Auftrennung ebenfalls über RP-LC erfolgte.

Der Gradient begann bei 5 % ACN (v/v) / 0,1 % FA (v/v) in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  und stieg innerhalb von 120 min auf 40 % ACN (v/v) / 0,1 % FA (v/v) in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  an. Das System war mit dem nanoESI-LTQ-Orbitrap Velos Pro MS *online*-gekoppelt. Die Ionisation erfolgte in der Nanospray Flex Ionenquelle bei einer Sprayspannung von 3,5 kV und einer Kapillarspannung von 50 V. Der akquirierte  $m/z$ -Bereich auf Vorläuferionenebene betrug 400-1850 bei einem Massenauflösungsvermögen von 60.000. Pro MS-Scan wurden die 10 abundantesten Vorläuferionen mit einer Breite des Isolationsfensters von 2 Th ausgewählt. Einfach geladene Ionen wurden nicht verwendet. Bereits ausgewählte Ionen wurden mit einer Toleranz von 5 ppm für die nächsten 30 s von der Fragmentierung dynamisch ausgeschlossen. Die Dissoziation erfolgte durch CID mit einer NE von 35 %, wobei entsprechende Fragmentionen in der linearen Ionenfalle analysiert wurden.



Die globale Analyse DES/IDES-enthaltender Peptide wurde ebenfalls an dem LTQ-Orbitrap Velos Pro MS durchgeführt. Die chromatographischen Parameter blieben unverändert, jedoch wurde eine modifizierte massenspektrometrische Methode verwendet. Der akquirierte  $m/z$ -Bereich im Vorläuferionen-Modus betrug hier 350-1250. Diesem nachgeschaltet war jedoch kein ionenabhängiger Tandem-MS-Modus, sondern die Isolation eines 100 Th großen Massenfensters, beginnend bei  $m/z$  400, was einem selektierten Fenster zwischen  $m/z$  350 und  $m/z$  450 entsprach. Die so ausgewählten Ionen wurden anschließend bei 95 % NE fragmentiert, um so evtl. vorhandene DES/IDES-Reporterionen freizugeben. Diese Fenster wurden bis  $m/z$  1250 periodisch durchlaufen. Eine schematische Übersicht dieser entwickelten Methode ist in Abb. 14 dargestellt.

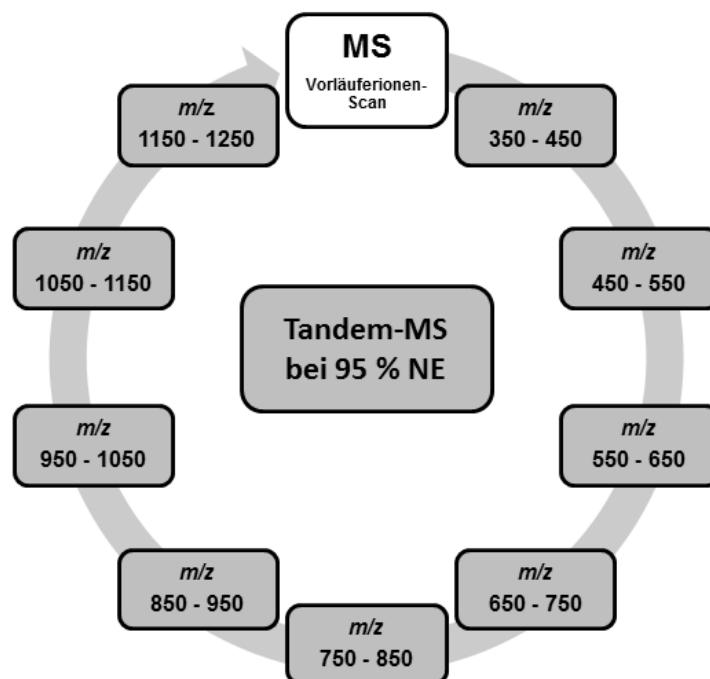


Abb. 14: LTQ-Orbitrap Velos Pro-Methode zur Detektion von DES/IDES-enthaltenden Peptiden

### 3.3.6 NanoLC-nanoESI-Orbitrap Fusion Tribid Massenspektrometrie

Zur Identifizierung und Sequenzierung nativ quervernetzter Peptide in Elastin wurde das nanoESI-Orbitrap Fusion Tribid MS verwendet, das *online* mit einem Ultimate 3000 RSLCnano-System gekoppelt war. Proteolytische Verdauung wurde zunächst auf die Vorsäule geladen und für 15 min mit 0,1 % TFA in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen. Anschließend erfolgte die Auf-

trennung mittels RP-LC bei einer Flussrate von  $0,300 \mu\text{L min}^{-1}$ . Der Gradient startete bei 1 % ACN (v/v) / 0,1 % FA in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  und stieg auf 35 % ACN (v/v) / 0,1 % FA in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  innerhalb von 60 min an. Die Ionisation erfolgte in einer Nanospray Flex Ionenquelle. Vorläuferionenspektren wurden bei einem Massenaufklärungsvermögen von 120.000 aufgenommen und der akquirierte  $m/z$ -Bereich betrug hierbei 200-2000. Pro MS-Scan wurden die 16 abundantesten Vorläuferionen mit einer Isolationsbreite von 2 Th im Quadrupol ausgewählt und mittels CID bei 35 % NE fragmentiert. Die Tandem-MS-Messung erfolgte in dem Orbitrap-Analysator bei einer Auflösung von 15.000. Dies entspricht einer Zyklus-Zeit von 5 s. Bereits ausgewählte Ionen wurden für die nächsten 60 s mit einer Toleranz von 2 ppm dynamisch ausgeschlossen.

### 3.4 Bioinformatische Methoden

In der vorliegenden Arbeit sind Ionen innerhalb von Massenspektren, die mittels nanoESI-QqTOF MS und MALDI-TOF/TOF MS akquiriert wurden, mit zwei Nachkommastellen aufgeführt. Spektren, die durch den Orbitrap-Massenanalysator gewonnen wurden, sind aufgrund der höheren Massengenauigkeit mit vier Nachkommastellen aufgeführt. Theoretische monoisotopische Massen sind mit vier Nachkommastellen aufgeführt.

#### 3.4.1 Sequenzierung linearer Peptide

Lineare Peptide wurden mittels der Software PEAKS (203) sequenziert. Am MALDI-TOF/TOF MS gewonnene Daten wurden dazu zunächst mittels der Software Mascot Distiller in das für PEAKS lesbare MGF-Format umgewandelt und präprozessiert. Am nanoESI-LTQ-Orbitrap Velos Pro MS sowie am nanoESI-Orbitrap Fusion Tribrid MS generierte Daten wurden direkt als Rohdaten (RAW-Format) in die PEAKS Software eingeladen. Durch eine *de novo*-Sequenzierung mit anschließendem Datenbankabgleich (SwissProt, jeweils aktuelle Version) erfolgte die Peptidentifizierung. Die Aminosäuresequenzen von TE1 und TE2 aus *XTR* wurden aus Chung *et al.* (66) und Miao *et al.* (231) übernommen und manuell in die bestehende *Swiss-Prot*-Datenbank integriert. Wurde die Probe zuvor reduziert und alkyliert, so wurde als feststehende Modifikation die Carbamidomethylierung von Cystein (Massenunterschied +57,0215 Da) in der Suche berücksichtigt. Diente natives, isoliertes Elastin als Substrat, wurden als variable PTMs darüber hinaus die Hydroxylierung von Prolin (Massenunterschied +15,9949 Da) sowie die oxidative Desaminierung von Lysin zu Allysin (Massenunterschied -1,0316 Da) definiert. In einer wiederholten Suche wurde  $\alpha$ -Aminoadipinsäure als va-

variable Modifikation von Lysin (Massenunterschied +14,9663 Da) implementiert (vgl. Kap. 4.5.1). Bei Elastin aus *XTR* wurde darüber hinaus die Desaminierung von Glutamin und Asparagin (Massenunterschied +0,9840 Da) in den Suchalgorithmus implementiert. Die Suche erfolgte mit einer Toleranz auf Vorläuferionenebene von 30 ppm (MALDI-TOF/TOF MS), 25 ppm (nanoESI-QqTOF MS), 5 ppm (nanoESI-LTQ-Orbitrap Velos Pro MS) sowie 2 ppm (nanoESI-Orbitrap Fusion Tribrid MS). Auf Fragmentationenebene wurde eine maximale Abweichung von 0,3 Da (MALDI-TOF/TOF MS), 0,1 Da (nanoESI-QqTOF MS), 0,8 Da (nanoESI-LTQ-Orbitrap Velos Pro MS) sowie 0,015 Da (nanoESI-Orbitrap Fusion Tribrid MS) zugelassen. Die Grenze des Peptidscores wurde soweit gesenkt, bis eine FDR von  $\leq 1\%$  erreicht war. Aminosäureaustausche und weitere PTMs wurden durch sich anschließende Sequenzierungen mit den Algorithmen PEAKS PTM und SPIDER (202) identifiziert.

### **3.4.2 Sequenzierung intrapeptidal bifunktional quervernetzter Peptide**

Die Identifizierung intrapeptidal quervernetzter Peptide erfolgte ebenfalls mit PEAKS unter Verwendung modifizierter Datenbanken für die drei unterschiedlichen Organismen (vgl. Abb. A. 3). Hierbei wurden die paarweise angeordneten Lysine sowie die dazwischenliegenden Aminosäuren der Quervernetzungsdomänen auf ein einzelnes Lysin und eine künstliche PTM reduziert. Der Massenunterschied dieses Lysins zu der Masse des intrapeptidal quervernetzten Motivs, inklusive der zwischen den Lysinen liegenden Aminosäuren, wurde jeweils als variable PTM für die bifunktionalen Quervernetzungstypen AA,  $\Delta$ -LNL und LNL implementiert (vgl. Tab. A. 2). Hierdurch ergaben sich pro Organismus bis zu 24 verschiedene mögliche PTMs, die durch die Diversität der dazwischenliegenden Aminosäuren erklärt werden können (acht verschiedene Aminosäurekombinationen und drei verschiedene Quervernetzer). Die weitere Sequenzierung erfolgte wie in Kap. 3.4.1 beschrieben mit einer FDR von  $\leq 2\%$ . Die annotierten Fragmentspektren aller identifizierten Peptide wurden manuell überprüft.

### **3.4.3 Sequenzierung interpeptidal bifunktional quervernetzter Peptide**

Die Sequenzierung interpeptidal quervernetzter Peptide erfolgte durch die beiden Programme StavroX (212) und PolyLinX (223). StavroX wurde zur Detektion chemisch quervernetzter Peptide entwickelt. Es wurde verwendet, da sich die bifunktionalen Aminosäuren AA, LNL und  $\Delta$ -LNL als Quervernetzer einfügen ließen und die Software in der Lage dazu ist, auch unspezifisch gespaltene Peptide zu identifizieren. Die in dieser Arbeitsgruppe entwickel-

te Software PolyLinX ist dazu in der Lage, auch höherfunktional quervernetzte Elastinpeptide zu identifizieren. Durch die hohe Anzahl von möglichen Kombinationen kam es jedoch bei beiden Programmen sehr häufig zu falsch positiven Ergebnissen, weswegen stets eine manuelle Überprüfung erfolgte. Die Rohdaten wurden zunächst mittels PEAKS prozessiert und in das für die Programme lesbare MGF-Format umgewandelt. LNL,  $\Delta$ -LNL und AA wurden bei der StavroX-Software als mögliche Quervernetzer von Lysin mit einem Massenverlust von je 17,0265 Da, 19,0422 Da sowie 20,0738 Da gegenüber zwei Lysinen implementiert. Als TE-Sequenz wurde für bovines Elastin IF 1 gewählt (SwissProt-Nummer: P04985-1) und für humanes Elastin IF 2 (P15502-2). Carbamidomethyliertes Cystein (Massenunterschied +57,0215 Da) wurde wiederum als fixe Modifikation gewählt. Die verwendeten Aminosäuresequenzen der beiden TEs vom tropischen Krallenfrosch sind in Abb. A. 1 (TE1) und Abb. A. 2 (TE2) dargestellt. Die gewählten Fehlertoleranzen auf Vorläufer- und Fragmentationenebene waren abhängig vom verwendeten Instrument, wie in Kap. 3.4.1 beschrieben.

Darüber hinaus wurden bifunktional quervernetzte Peptide identifiziert, indem in PEAKS nach Fragmentspektren gesucht wurde, die lokal eine Peptidsequenz mit einem hohen *de novo*-Score aufwiesen, die sich N- oder C-terminal zu Quervernetzungsmotiven befand, jedoch keinen Datenbanktreffer für lineare Peptide ergab. Durch manuelle Überprüfung des Spektrums wurde evaluiert, ob es sich tatsächlich um ein bifunktional quervernetztes Peptid handelte, indem die Masse der bereits identifizierten Aminosäuresequenz von der Masse des Vorläuferions abgezogen wurde und unter Berücksichtigung der möglichen bifunktionalen Aminosäuren (LNL,  $\Delta$ -LNL und AA) danach gesucht wurde, ob die Masse anderer Aminosäuren oder Peptide der fehlenden Masse entspricht. War das der Fall, so wurde im Tandem-MS-Spektrum nach den zugehörigen Fragmentationen gesucht. Waren auch diese vorhanden, so wurde das Spektrum als interpeptidal bifunktional quervernetzt klassifiziert.

### **3.4.4 Identifizierung und Sequenzierung tetrafunktional quervernetzter Peptide**

Auf Basis des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten DESGET-Algorithmus (227) wurde zunächst festgestellt, ob ein Peptid DES/IDES enthielt oder nicht. Hierzu wurde das bei einer Kollisionsenergie von  $\geq 90$  eV aufgenommene HCD-Spektrum eines Vorläuferions einer statischen Messung bzw. eines LC-MS Laufes mit entsprechenden Fragmentspektren zunächst in das DTA- bzw. PKL-Format umgewandelt und anschließend mittels DESGET prozessiert. Der Algorithmus kann darüber hinaus auch MGF-Datensätze einlesen. DES/IDES-

enthaltende Peptide (Score  $\geq 0,9$ ) wurden ausgewählt und sowohl mithilfe der Software Poly-LinX als auch manuell unter Zuhilfenahme der Programme GPMW, XLinkFragmenter und MS-COMP sequenziert.

### 3.4.5 Moleküldynamiksimulationen bifunktional quervernetzter Peptide

Die Sekundärstrukturen der zwei intrapeptidal quervernetzten tryptischen Peptide aus *in vitro* mittels ANAO (*Aspergillus nidulans* Aminoxidase, ANAO) quervernetztem TE (ANAO-TE) aus der vorangegangenen Masterarbeit (229) wurden zusätzlich mithilfe von Moleküldynamik (MD)-Simulationen untersucht. Um zu ermitteln, wie die Quervernetzung AA die Sekundärstruktur beeinflusst, wurden MD-Simulationen sowohl von den linearen, als auch den quervernetzten Peptiden entsprechend Heinz *et al.* (232) durchgeführt. Eine Übersicht der modellierten Peptide ist in Tab. 1 dargestellt. PX1 und PX2 stellen die beiden identifizierten quervernetzten Peptide dar. P3/P4 sowie P7/P8 dienen dazu, zu untersuchen, wie die Quervernetzung möglicherweise gebildet wurde und wie die Quervernetzung die Struktur des Peptides beeinflusst. P5/P6 beinhalten einen P→A-Austausch an Position 9 der Peptide P3/P4.

**Tab. 1: Lineare und quervernetzte Peptide identifiziert in ANAO-TE, die mittels MD-Simulationen untersucht wurden**

Lya stellt Allysin dar, wohingegen K Allysinreste darstellt, die in eine bifunktionale Quervernetzung (AA) eingebunden sind.

Aminosäuresequenz	Peptid	Monoisotopische Masse [Da]	Position in TE IF 2
AA <u>K</u> YGVGTPAAAAA <u>K</u> AAAK	PX1	1666,87	449-467
SAA <u>K</u> VAA <u>K</u> AQLR	PX2	1192,67	530-541
AA-Lya-YGVGTPAAAAA-Lya-AAAK	P3	1684,88	449-467
AAKYGVGTPAAAAAKAAAK	P4	1686,94	449-467
AA-Lya-YGVGTAAAAAA-Lya-AAAK	P5	1658,86	-
AAKYGVGTAAAAAAKAAAK	P6	1660,93	-
SAA-Lya-VAA-Lya-AQLR	P7	1210,67	530-541
SAAKVAAKAQLR	P8	1212,73	530-541

Die MD-Simulationen wurden mithilfe der GROMACS-Software (233) unter Verwendung des OPLS-aa-Kraftfeldes (234) durchgeführt. Die Parameter für AA und Allysin wurden

manuell implementiert. Vor der Simulation wurden Wasser (SPC/E-Modell) und entsprechende Gegenionen hinzugefügt. Nach Energieminimierung und Äquilibration des Systems wurde die Moleküldynamiksimulation bei 37 °C und 1 bar für 100 ns durchgeführt, wobei Druck und Temperatur konstant gehalten wurden. Dies geschah unter Verwendung des SHAKE-Algorithmus mit einer Schrittweite von 2 fs (235).

### 3.4.6 Molekulares Docking

Mithilfe molekularer Docking-Simulationen wurde überprüft, ob PE auch innerhalb von tetrafunktional quervernetzten Peptiden hydrolytisch spalten kann. Dieses wurde am Beispiel des DES-quervernetzten Peptides AKAAKFGAA\_AAKAAAKAAA simuliert. Zunächst wurde das entsprechende quervernetzte Peptid mithilfe der Monte-Carlo-Methode sowie des AMBER-Kraftfeldes (236) konformationell simuliert. 156 mögliche Konformationen des Peptides wurden mithilfe eines Fensters von 20 kcal mol<sup>-1</sup> generiert und für die sich anschließenden Docking-Simulationen durch GOLD (237) mit der Kristallstruktur von PE (PDB ID 1H9L) verwendet. Der Serinrest S214 im aktiven Zentrum von PE sowie Aminosäuren in dem Radius von 15 Å wurden als Bindestelle definiert. Vor der Simulation wurden Wasser (TIP3P-Modell) und entsprechende Gegenionen hinzugefügt. Die Energieminimierung des Systems verlief in zwei Schritten: Zunächst wurde die intrinsische Energie des gelösten Peptides minimiert und daraufhin die des gesamten Systems. Die sich anschließenden Moleküldynamiksimulationen wurden bei 37 °C und einem Druck von 1 bar mithilfe des NPT-Ensembles für 20 ns durchgeführt. Dies geschah unter Verwendung des SHAKE-Algorithmus mit einer Schrittweite von 2 fs (235).

### 3.4.7 Bestimmung der Spaltspezifität von Proteasen

Die Ermittlung der Spaltspezifität wurde für Aminosäuren in der P1- und der P1'-Position der gespaltenen Peptidbindung durchgeführt. Die Spezifität wurde als normalisierte Wahrscheinlichkeit (Normalisierte Aktivität, NA) dafür ausgedrückt, dass in der jeweiligen Position gespalten wird. Die Berechnung erfolgte nach Keil (238) wie in Gleichung 4 angegeben. NA<sub>i</sub> stellt die normalisierte Aktivität der Protease gegenüber der Aminosäure AS<sub>i</sub> dar:

$$NA_i = \frac{\left( \frac{\text{Anzahl Spaltungen mit } AS_i \text{ in Position P1 oder P1'}}{\text{Gesamtzahl identifizierter Peptide}} \right)}{\left( \frac{\text{Anzahl } AS_i \text{ in Sequenz}}{\text{Gesamtzahl AS in Sequenz}} \right)} \quad \text{Gleichung 4}$$

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Elastinähnliche Biomaterialien und Tropoelastin als Modellsubstrate

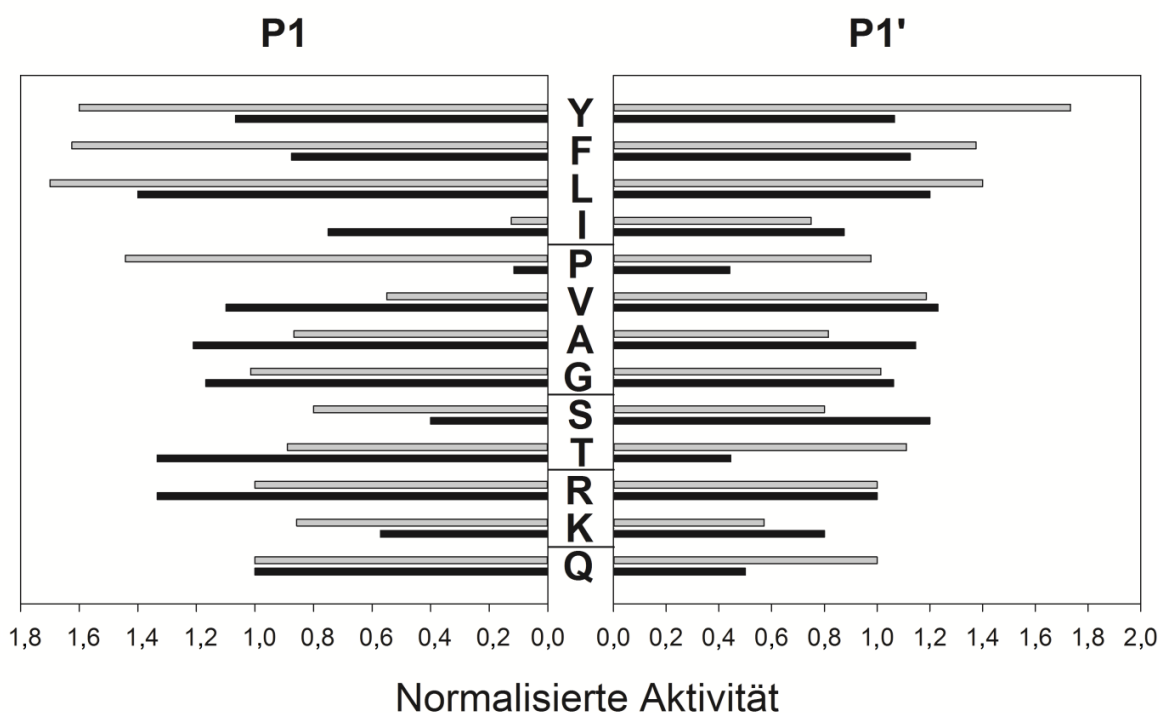
Zu einer zuverlässigen Identifizierung quervernetzter Peptide in proteolytischen Verdauen war es zunächst notwendig, die Spaltspezifität der verwendeten Protease Pankreaselastase (PE), isoliert aus *Sus scrofa*, anhand des löslichen Vorläuferproteins TE zu evaluieren. Bei PE handelt es sich um eine aggressive Serinprotease, deren elastolytische Eigenschaften bereits in mehreren Studien nachgewiesen wurden (239-241). Weiterhin wurde ein Proteaseextrakt aus der fleischfressenden Kannenpflanze (*Nepenthes*) untersucht, um zusätzlich evtl. elastolytische Eigenschaften nachzuweisen und zu ermitteln, ob der Extrakt eine Alternative zu PE in der Identifizierung quervernetzter Peptide darstellen könnte, wenn er eine höhere Spaltspezifität als PE aufweist. Zusätzlich wurde *in vitro* quervernetztes TE als Modellsubstrat massenspektrometrisch untersucht, um die proteolytische Resistenz dieses Biomaterials mit nativem humanem Elastin zu vergleichen. Zuvor identifizierte quervernetzte Peptide wurden darüber hinaus Moleküldynamiksimulationen unterworfen, um festzustellen, inwiefern sich diese *in vitro* ausgebildet hatten und ob sich daraus neue strukturelle Eigenschaften von TE ableiten lassen, die dann auf natives Elastin übertragen werden können.

#### 4.1.1 Degradation von Tropoelastin und Elastin durch verschiedener Proteasen

Rekombinant hergestelltes TE wurde für 20 h verdaut und die freigesetzten Peptide anschließend massenspektrometrisch untersucht (vgl. Kap. 3.3.5). Anhand der ermittelten Peptide wurde die relative Spaltspezifität von PE hinsichtlich TE als Substrat ermittelt. Diese ist in Abb. 15 angegeben. Die zur Peptidbindung C-terminal liegende Aminosäure wird auch als Aminosäure in P1-Position bezeichnet. Die N-terminal zur Spaltstelle liegende Aminosäure befindet sich in der Position P1'. Es wird deutlich, dass PE hinsichtlich der P1-Position bevorzugt hinter Leucin (NA = 1,5) spaltet, wenngleich die proteolytische Aktivität gegenüber anderen Aminosäuren ähnlich hoch ist und zwischen 0,6 NA und 1,35 NA schwankt. Befindet sich jedoch Prolin in der P1-Position, beträgt die normalisierte Aktivität (NA) nur noch 0,1. Bezogen auf die P1'-Position ergibt sich ein ähnliches Bild hinsichtlich der NA, wenngleich die Aktivität gegenüber Prolin dort fünfmal höher ist und ca. 0,5 beträgt. Die Sequenzabdeckung von TE unter Berücksichtigung des abgespaltenen Signalpeptides betrug in einem pro-

teolytischen Verdau durch PE 85 %. Fehlende Sequenzen waren meist in KA-Domänen und der C-terminalen Domäne 36 zu finden. Die Sequenzabdeckung der hydrophoben Abschnitte betrug hingegen annähernd 100 % (vgl. Abb. A. 4). Vergleichend dazu wurde ein Proteaseextrakt isoliert aus *Nepenthes* verwendet, um zu untersuchen ob dieser als erstes bekanntes pflanzliches Proteasegemisch dazu in der Lage ist, intaktes Elastin abzubauen. Dies erschien möglich, da es sich um eine fleischfressende Pflanze handelt. Dazu wurden jeweils TE und isoliertes Elastin aus der Mauseorta bei 37 °C für 20 h mit dem Extrakt inkubiert. Mausegewebe wurde gewählt, da es sich um ein potenzielles Beutetier handelt. Um die Degradation zeitabhängig nachzuverfolgen, wurden Proben zu bestimmten Zeitpunkten entnommen und mittels MALDI-TOF MS sowie - zur Sequenzierung von Peptiden - mittels nanoHPLC-nanoESI-LTQ-Orbitrap Velos Pro untersucht. Es zeigte sich, dass das Elastin aus der Mauseorta nach 20 h vollständig abgebaut war (vgl. Abb. A. 6). Intaktes TE (MW = 60 kDa) war bereits nach einer Minute nicht mehr nachweisbar (vgl. Abb. A. 7).

Die Berechnung der Spaltspezifität erfolgte auch für den *Nepenthes*-Extrakt anhand der identifizierten Peptide von TE. Die Sequenzabdeckung von TE betrug 84 %, wobei auch hier häufig KA-Domänen nicht wiedergefunden wurden (vgl. Abb. A. 5).



**Abb. 15: Spaltspezifität von PE und *Nepenthes*-Extrakt gegenüber rekombinant hergestelltem humanem TE IF 2**

Die NA von PE gegenüber Aminosäuren in TE ist als schwarzer waagerechter Balken dargestellt und die von dem *Nepenthes*-Extrakt als grauer Balken. Die Aktivität wurde entsprechend Gleichung 3 berechnet. Aminosäuren sind aufgrund ihrer Eigenschaften gruppiert.



Im Gegensatz zu PE werden durch den *Nepenthes*-Extrakt nicht nur Leucin, sondern auch Phenylalanin und Tyrosin in P1-Position ähnlich bevorzugt gespalten, auch wenn nach allen anderen Aminosäuren ebenfalls gespalten wurde. Der *Nepenthes*-Extrakt spaltet die Peptidbindung mit Prolin in P1-Position deutlich häufiger als PE (NA = 1,4), jedoch verhindert Isoleucin in dieser Position die Spaltung fast vollständig. Die P1'-Position wurde ähnlich unspezifisch hydrolysiert wie bei PE. Für PE und den *Nepenthes*-Extrakt zeigte sich, dass die Sequenzabdeckung von TE ähnlich hoch war und beide Enzyme eine niedrige Spaltspezifität besaßen, wobei der *Nepenthes*-Extrakt deutlich häufiger C-terminal von Prolin spaltete. Da dies die Sequenzierung quervernetzter Peptide aber nicht erleichtert, wurde in weiterführenden Experimenten hochreine PE als Standardprotease zur Identifizierung von quervernetzten Peptiden aus Elastin verwendet.

#### **4.1.2 Massenspektrometrische Charakterisierung von quervernetztem Tropoelastin**

In der dieser Doktorarbeit vorangegangenen Masterarbeit des Autors wurde *in vitro* quervernetztes TE (ANAO-TE) verwendet (vgl. Kap. 3.2.4), um anhand dessen erstmals elastintypische quervernetzte Peptide zu identifizieren (229). Bei ANAO handelt es sich genau wie bei LOX um eine Aminoxidase, die dazu in der Lage ist, Lysinreste zu Allysin zu konvertieren, die daraufhin die gleichen Quervernetzungstypen ausbilden wie natives Elastin. Dies diente in der Masterarbeit als Modellsubstrat, bevor der Schritt zu nativem Elastin getan wurde. Das Biomaterial wurde in der vorliegenden Arbeit nach proteolytischen Verdauen mit PE, Chymotrypsin und Trypsin vergleichend mit humanem Elastin zunächst nach chromatographischer Vortrennung *offline*-gekoppelt am MALDI-TOF/TOF MS analysiert, um exakte Unterschiede hinsichtlich der proteolytischen Resistenz zu ermitteln (vgl. 3.3.2). Darüber hinaus wurde der DES/IDES-Gehalt des Biomaterials und Elastin aus humaner Aorta ermittelt und verglichen. Dies geschah unter Verwendung einer in dieser Arbeit entwickelten LC-MS-Methode zur quantitativen Analyse von DES und IDES (vgl. 3.3.1) und diente einerseits dazu zu zeigen, wie sich die Substrate hinsichtlich ihrer proteolytischen Resistenz unterscheiden und andererseits, um zu ermitteln, wie hoch der Grad der Quervernetzung ist. Es zeigte sich, dass der DES/IDES-Gehalt in humanem Aortenelastin mit  $24,8 \mu\text{g} \pm 5,3 \mu\text{g}$  pro mg Substrat am höchsten war. Der DES/IDES-Gehalt von ANAO-TE lag nur bei  $3,8 \mu\text{g} \pm 0,2 \mu\text{g}$  pro mg Substrat und war damit 6,5-fach niedriger als bei nativem Elastin. Da die beiden Isomere DES und IDES unter den chromatographischen Bedingungen koeluiieren, ist eine Berechnung des

Verhältnisses der beiden zueinander nicht möglich (223). Bezüglich der enzymatischen Spaltung der beiden Substrate wurden nachfolgende Ergebnisse erhalten.

Humanes Aortenelastin wurde durch PE vollständig abgebaut, jedoch durch Trypsin und Chymotrypsin nur partiell (vgl. Abb. A. 8). So war das Substratpellet nach 20 h Inkubation immer noch mit bloßem Auge im Reaktionspuffer sichtbar. Es wurden lediglich zwei tryptische und vier chymotryptische Peptide identifiziert. Im Gegensatz dazu wurde das Biomaterial ANAO-TE durch alle drei Proteasen vollständig abgebaut. Dies spiegelte sich einerseits darin wider, dass das in Wasser und organischen Lösungsmitteln ebenfalls unlösliche Substrat nach 20 h Inkubation nicht mehr erkennbar war, und andererseits darin, dass sich deutlich mehr tryptische und chymotryptische Peptide wiederfanden als bei humanem Elastin (vgl. Abb. A. 9). Eine genaue Charakterisierung der freigesetzten Peptide aus humanem Aortenelastin mittels PE unter Verwendung des höher auflösenden und sensitiveren Massenspektrometers Orbitrap Fusion Tribrid wird in Kap. 4.3 gezeigt.

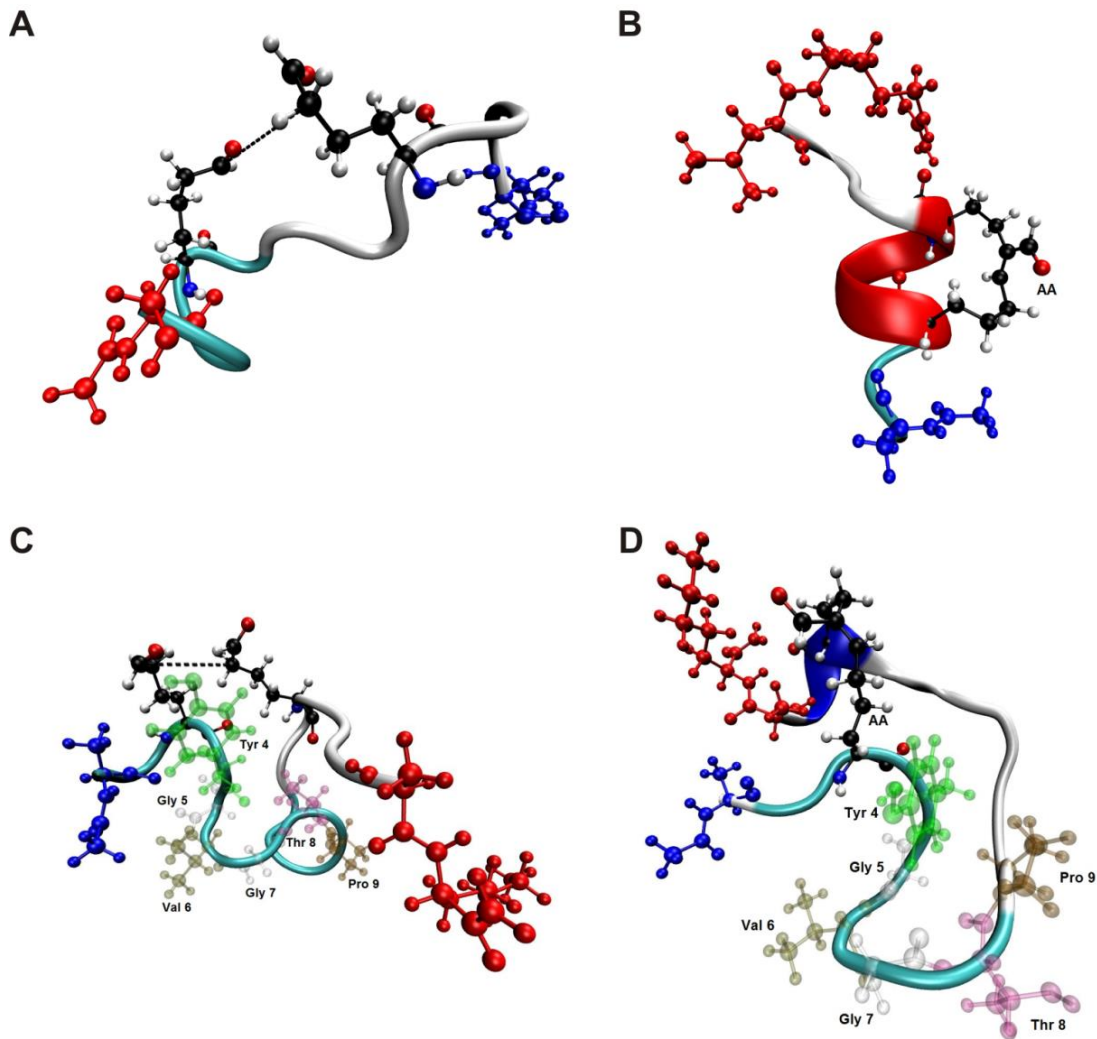
#### 4.1.3 Moleküldynamiksimulationen quervernetzter Peptide

Die in Schröder (229) identifizierten bifunktional intrapeptidal quervernetzten Peptide aus ANAO-TE wurden mittels MD-Simulationen eingehend untersucht. Ziel war es herauszufinden, wie diese entstanden sein können und welche dreidimensionale Konformation das verbückte Peptid durch die Quervernetzung einnimmt. Für das verkürzte Peptid AAKVAAKAQ wurde dort bereits gezeigt, dass dieses eine  $\alpha$ -helikale Konformation einnimmt. Das sollte nun für das vollständige tryptische Peptid SAAKVAAKAQLR bestätigt werden.

Die beiden Peptide sind in den humanen Domänen 25 (<sup>565</sup>SAAKVAAKAQLR) sowie die Domänen 21 und 23 umspannend (Domäne 22 ist in der verwendeten TE IF 2 nicht enthalten) (<sup>464</sup>AAKYGVGTPAAAAAKAAAK) zu finden. Beide waren an den unterstrichenen Lysinen durch AA quervernetzt. MD-Simulationen wurden für drei verschiedene Zustände der Peptide durchgeführt. Die erste Variante beinhaltete unmodifizierte Lysine (P8, SAAKVAAKAQLR und P4, AAKYGVGTPAAAAAKAAAK), die zweite Variante zu Allysin oxidierte Lysine (P7, SAA-Lya-VAA-Lya-AQLR und P3, AA-Lya-YGVGTPAAAAA-Lya-AAAK) und die dritte Variante jeweils das zu AA verbückte Peptid (PX2, SAAKVAAKAQLR und PX1, AAKYGVGTPAAAAAKAAAK). Die ersten beiden Peptidpaare dienten dazu, zu untersuchen, wie sich die Quervernetzung ausgebildet hatte und inwiefern Allysin die Konformation des jeweiligen Peptids beeinflusst. Die MD-Simulationen mit dem jeweils AA-vernetzten Peptid wurden durchgeführt, um *in silico* festzustellen, welche Konformation das vernetzte

Peptid *in vitro* einnahm. MD-Simulationen der Peptide wurden entsprechend Kap. 3.4.5 durchgeführt. Der Abstand zwischen dem C $\delta$ -Atom des N-terminal liegenden Allysins und dem C $\epsilon$ -Atoms des C-terminal liegenden Allysins wurde innerhalb der MD-Simulationen gemessen, um zu überprüfen, ob sich diese beiden räumlich so nahe kommen können, dass sich unter Hydrolyse spontan AA ausbilden kann. Die frequentielle Verteilung der C $\epsilon$ -C $\delta$ -Abstände im Laufe der 100 ns Simulation ist in Abb. A. 10 angegeben. Es wird deutlich, dass dieser Abstand jeweils dann am geringsten war, wenn es sich um die Peptide mit zwei Allysinen handelte (P3 und P7). Für die beiden Peptide P3 und P7 wurden dort jeweils minimale Abstände von 3,2 Å (P3; Domänen 21/23) und 3,3 Å (P7; Domäne 25) ermittelt. Dieser Abstand ist gering genug, dass sich AA *in silico* ausbilden kann. Bei diesen Peptiden handelt es sich um die direkten Vorläuferpeptide der finalen AA-Peptide PX1 und PX2. Die AA-Quervernetzung war bei beiden Peptiden PX1 und PX2 über die Dauer von 100 ns stabil. Bei dem verbrückten Peptid PX2 ermöglichte die Quervernetzung, dass die  $\alpha$ -helikale Konformation des Peptides stabilisiert wurde (vgl. Abb. 16 B). Eine mögliche Konformation, in der sich die beiden Allysine nahe genug waren, um spontan zu kondensieren, ist in Abb. 16 A gegeben. Dadurch, dass die Lysinreste durch drei Aminosäuren voneinander getrennt sind, werden die Seitenketten auf der gleichen Seite der  $\alpha$ -Helix positioniert, was die Ausrichtung dieser zueinander vereinfacht. Über alle untersuchten Peptide hinweg betrachtet war der mittlere C $\epsilon$ -C $\delta$ -Abstand bei den Peptiden P7 und P8 am geringsten. Eine zeitaufgelöste Berechnung des Abstandes für die quervernetzten Peptide PX1 und PX2 war nicht nötig, da der Abstand durch die eingefügte Bindung konstant war. Abb. 16 C zeigt eine der Konformationen von P3, die die Ausbildung der Quervernetzung erlaubt. Wie zu sehen, stellt dabei das Prolin eine der zentralen Aminosäuren dar, die die scharnierartige Konformation der Region erlaubt. In Abb. 16 D ist repräsentativ eine der vorherrschenden Strukturen von PX1 gezeigt, nachdem sich die AA-Quervernetzung ausgebildet hatte.

Das vernetzte Motiv der Domänen 21/23 wird auch als Scharnier-Region (engl. *hinge region*) bezeichnet und es wird vermutet, dass es sich um eine Region handelt, die hinsichtlich der Koazervation von TE eine Schlüsselrolle einnimmt (242). Deshalb sollte untersucht werden, ob das zentral liegende Prolin zwischen den beiden Lysinen für die Ausbildung dieses Scharniers und somit zur Vernetzung der beiden Lysine notwendig ist.



**Abb. 16: Moleküldynamiksimulationen der bifunktional quervernetzten Peptide aus ANAO-TE**

N- und C-terminal liegende Aminosäuren sind rot bzw. blau dargestellt. C-Atome aus Lysin bzw. quervernetzten Lysinseitenketten sind schwarz gezeigt. Abgebildet sind repräsentative Konformationen aus den MD-Simulationen von [A] SAA-Lya-VAA-Lya-AQLR [B] SAAKVAAKAQLR [C] AA-Lya-YGVGTPAAAAA-Lya-AAAK und [D] AAKYGVGTPAAAAAKAAAK. Entnommen aus Heinz *et al.* (232).

Von Prolinresten ist bekannt, dass sie aufgrund der cis-trans-Isomerie die Ausbildung solcher Konformationen in der cis-Konfiguration begünstigen können (243). Aus diesem Grund wurde zusätzlich zu den nativ vorkommenden Peptiden noch das Peptid P6 AAKYGVGT(P→A)AAAAAKAAAK sowie P5 AA-Lya-YGVGT(P→A)AAAAA-Lya-AAAK untersucht. Für diese Peptide - unabhängig ob Lysin oder Allysin - zeigte sich, dass sie weniger flexibel waren und sich die beiden Allysinseitenketten räumlich nicht mehr nahe genug kamen, um die Quervernetzung ausbilden zu können. So lag hier der minimale Abstand zwischen den C<sub>ε</sub>- und C<sub>δ</sub>-Atomen der Lysine oder Allysine von P5 bei 8,8 Å. (vgl. Abb. A. 10). Dies ist ein zu großer Abstand, als dass dadurch die beiden Seitenketten miteinander kondensieren können.

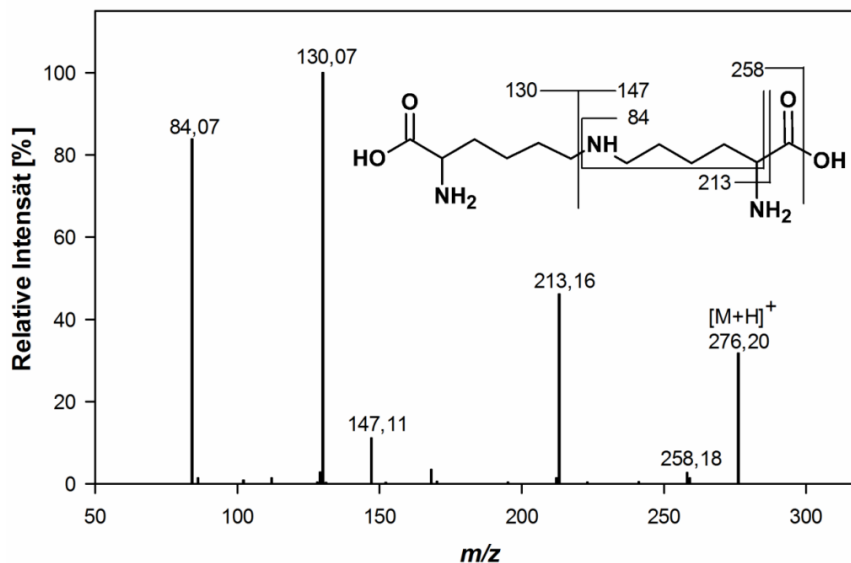
## 4.2 Methodische Entwicklungen zur Identifizierung quervernetzter Elastinpeptide

Die Identifizierung der beiden quervernetzten Peptide in ANAO-TE wurde dadurch erleichtert, dass als Protease bei diesem Substrat aufgrund des geringeren Quervernetzungsgrades das spezifisch spaltende Trypsin verwendet werden konnte (232). Der proteolytische Verdau einzelner oder weniger Proteine mit Trypsin, gefolgt von einer einfachen massenspektrometrischen Analyse der Vorläuferionen, kann bereits die Identifizierung dieser Proteine basierend auf den Massen der tryptischen Peptide erlauben (244). Da die proteolytischen Verdau von nativem Elastin jeweils mit PE durchgeführt wurden, das eine sehr niedrige Spaltspezifität aufweist (vgl. Kap. 4.1.1), war es notwendig nach Strategien zu suchen, um quervernetzte Elastinpeptide anderweitig eindeutig zu identifizieren. Das Wissen, ob ein Peptid quervernetzt oder linear ist, erleichtert die sich anschließende Sequenzierung entscheidend. Von anderen Aminosäuren ist bekannt, dass sie im Zuge der Fragmentierung durch CID sogenannte Immoniumionen mit der allgemeinen Summenformel  $RCH=NH_2^+$  freigeben, die ihre Existenz innerhalb eines Peptides zweifelsfrei belegen (245). Deswegen sollte im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, ob die Quervernetzungsaminosäuren in Elastin ähnlich spezifische Ionen, sogenannte Reporterionen, freigeben, die es als Ionen innerhalb eines Fragmentenspektrums erlauben würden festzustellen, ob das entsprechende Peptid linear oder quervernetzt ist.

### 4.2.1 Kollisionsinduzierte Dissoziation von Lysinonorleucin

Zunächst wurde die Dissoziation von LNL untersucht, das durch Reduktion von  $\Delta$ -LNL *in vivo* entsteht und neben AA und DES/IDES eine der abundantesten Quervernetzungsaminosäuren in Elastin ist (246). Wie aus Abb. 17 ersichtlich ist, handelt es sich um ein symmetrisch aufgebautes Molekül mit einer monoisotopischen Masse von 275,1844 Da. Zur Tandemmassenspektrometrischen Analyse mittels nanoESI-QqTOF MS wurde das einfach protonierte Ion gewählt. Das dargestellte Fragmentenspektrum bei 20 eV Kollisionsenergie zeigt, dass neben Neutralverlusten durch Wasser bei  $m/z$  258,18 und der Carboxylgruppe in Verbindung mit der Aminofunktion des Aminosäurerückgrates ( $m/z$  213,16) vorrangig Fragmentationen entstanden, die durch die Dissoziation der  $C_\epsilon$ -N- $C_\epsilon$ -Bindungen entstehen. Verblieb die Ladung an dem kürzeren Teil von LNL, konnte das Fragmentation bei  $m/z$  130,07 beobachtet werden. Verblieb die Ladung an dem größeren Teil des Moleküls, wurde ein Fragmentation bei  $m/z$  147,11 freigesetzt. Bei diesem Ion handelt es sich formell um einfach protoniertes freies

Lysin. Eine Kombination dieses Bindungsbruchs mit dem beschriebenen Neutralverlust der Amino- und Carboxyfunktion führte zur Bildung eines Fragmentions bei  $m/z$  84,07.



**Abb. 17: CID-Spektrum von LNL bei 20 eV aufgenommen mittels nanoESI-QqTOF MS**

Die Strukturformel von ungebundenem LNL mitsamt bevorzugt gespaltener Bindungen im Zuge von CID ist zusätzlich mit dem Fragmentionenspektrum dargestellt.

Weiterhin wurde untersucht, wie sich die Fragmentierung mit zunehmender Kollisionsenergie verhält (vgl. Abb. A. 11). Das Vorläuferion war ab einer Kollisionsenergie von 28 eV nicht mehr detektierbar. Die Erhöhung der Energie führte zur kontinuierlichen Zunahme des Fragmentions bei  $m/z$  84. Bei einer applizierten Kollisionsenergie von 50 eV war es das einzige noch im Spektrum detektierbare Ion.

## 4.2.2 Kollisionsinduzierte Dissoziation von Desmosin und Isodesmosin sowie deren Derivaten

### 4.2.2.1 Kollisionsinduzierte Dissoziation von ungebundenem Desmosin und Isodesmosin

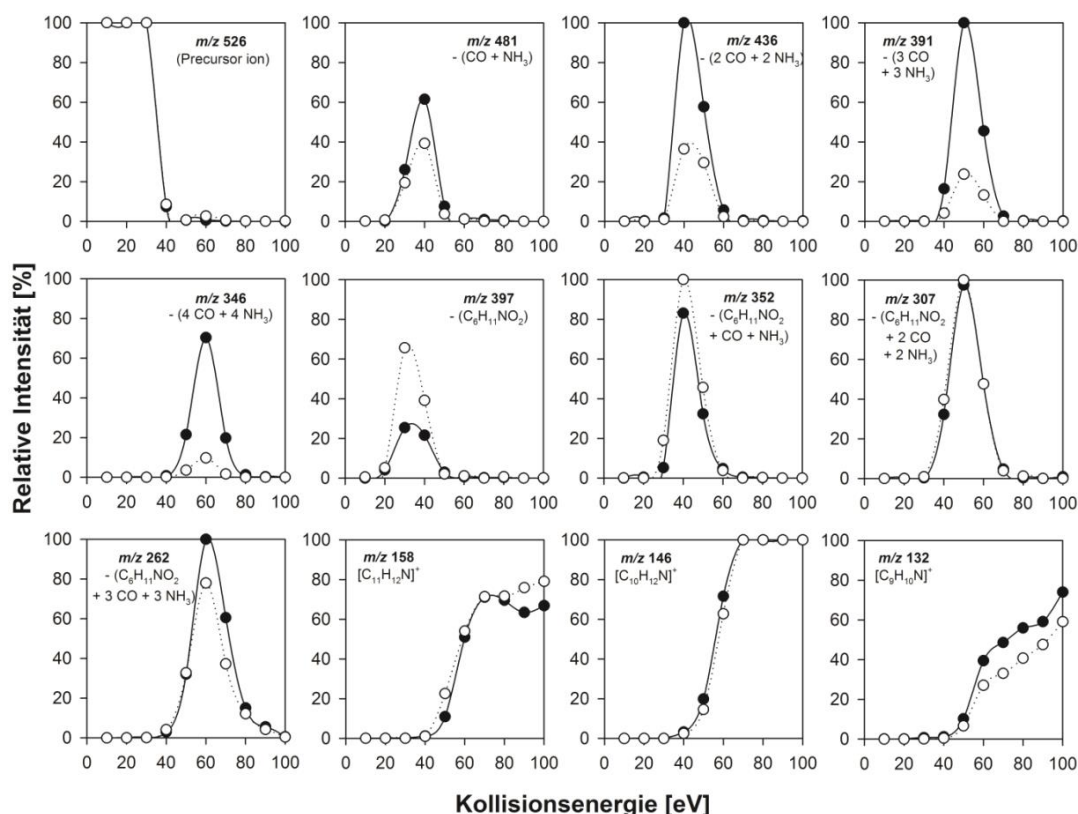
Bei DES und IDES handelt es sich um Strukturisomere mit einer monoisotopischen Masse von 526,2876 Da. DES/IDES gelten als wesentliche Voraussetzung für die Elastizität von Elastin. Formell handelt es sich um tetrafunktionale Aminosäuren, was nach der Definition in der vorliegenden Arbeit bedeutet, dass vier Lysinreste miteinander verknüpft wurden. DES und IDES unterscheiden sich durch die Position einer Alkylkette mit anhängender Aminosäurefunktion voneinander. Bei DES befindet sich diese Kette am C4-Atom des zentralen Pyridiniumrings, während sie sich bei IDES am C2-Atom befindet (vgl. Abb. 18). Da der Pyridiniumring am Stickstoff einfach positiv geladen ist, entspricht das Masse-zu-Ladung-Verhältnis



der C<sub>ε</sub>-N-Bindung zwischen der ehemaligen Lysinseitenkette und dem Pyridiniumstickstoff gekennzeichnet. Die abundantesten Fragmentionen sind eine Kombination dieser Dissoziationen. Der gestaffelte Verlust der CO+NH<sub>3</sub>-Gruppen führte zu folgender Ionenserie:

526 ([DES/IDES]<sup>+</sup>) → 481 ([DES/IDES - CO - NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>) → 436 ([DES/IDES - 2 CO - 2 NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>) → 391 ([DES/IDES - 3 CO - 3 NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>) → 346 ([DES/IDES - 4 CO - 4 NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>). Eine weitere abundante Ionenserie innerhalb des Fragmentspektrums ist eine Kombination aus dem Verlust der oben beschriebenen Alkylkette am Pyridiniumstickstoff sowie sequentiellen CO+NH<sub>3</sub>-Verlusten:

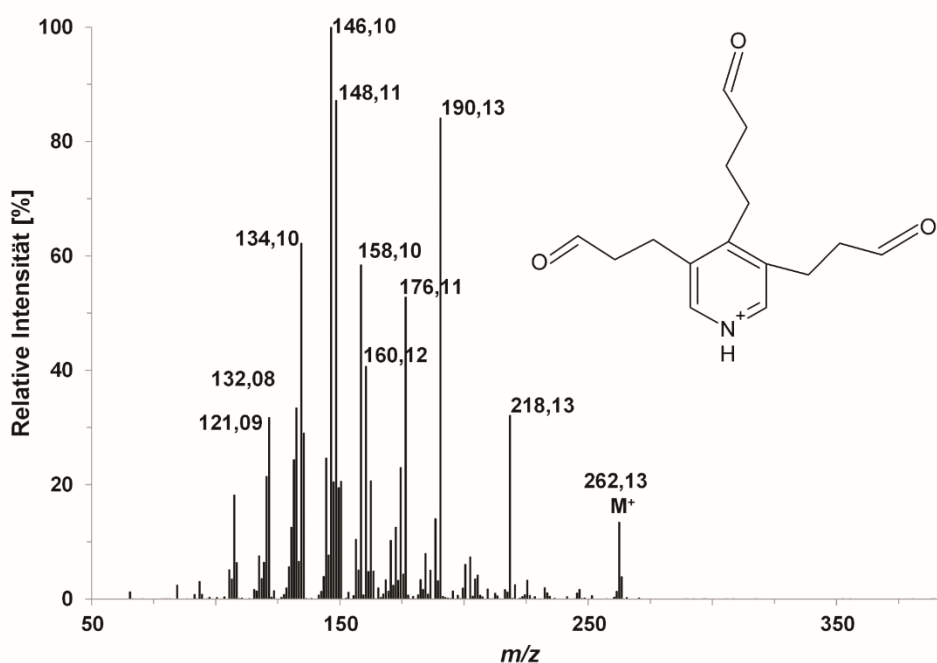
526 ([DES/IDES]<sup>+</sup>) → 397 ([DES/IDES - C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>) → 352 ([DES/IDES - C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub> - CO - NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>) → 307 ([DES/IDES - C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub> - 2 CO - 2 NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>) → 262 ([DES/IDES - C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub> - 3 CO - 3 NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>). Wurde die positive Ladung im Falle des C<sub>ε</sub>-N-Bindungsbruchs auf die ehemalige Lysinseitenkette übertragen, entstand das Fragmention mit dem *m/z*-Wert 130,09. Ein weiterer Verlust von CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zur Bildung des Fragmentions bei *m/z* 84,08. Eine kollisionsenergieaufgelöste Analyse der Fragmentierung von DES und IDES durch CID bis auf 100 eV ist in Abb. 19 gezeigt.



**Abb. 19: Abhängigkeit der Fragmentierung von DES und IDES durch CID von der Kollisionsenergie**  
 Alle Fragmentionenintensitäten von DES (schwarze Kreise) und IDES (weiße Kreise) sind relativ zu der Intensität des Basispeaks bei der entsprechenden Kollisionsenergie abgebildet. Modifiziert nach Schröder *et al.* (227).



Es wird deutlich, dass die Fragmentierung von IDES größtenteils durch den Verlust des ursprünglichen Lysins und damit verbundenen Fragmentionen charakterisiert ist (abundante Fragmentionen bei  $m/z$  397, 352 und 307), während die Dissoziation von DES eher durch den sequentiellen Verlust von  $\text{CO}+\text{NH}_3$  dominiert wird (abundante Fragmentionen bei  $m/z$  481, 436 und 391). Neben den erwähnten Fragmentionen führte die Dissoziation von DES/IDES zu der Bildung von zahlreichen weiteren, weniger abundanten Fragmentionen, die aus dem gleichzeitigen Verlust weiterer kleiner Gruppen resultieren (z.B.  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{CO}$ ). Das Fragmention bei  $m/z$  262 stellt das Ion dar, bei dem alle  $\text{CO}+\text{NH}_3$ -Gruppen sowie die Lysinseitenkette als Neutralverlust abgespalten wurden. Die weitere Fragmentierung dieses Ions durch Pseudo- $\text{MS}^3$  mittels nanoESI-QqTOF MS führte zu der Bildung einer Ionengruppe, die näherungsweise die Verteilung einer Gauss'schen Glockenkurve hatte (vgl. Abb. 20). Die  $m/z$ -Werte dieser Ionengruppe liegen zwischen 130 und 190. Das Fragmentierungsschema von  $m/z$  262 mit den entsprechenden Neutralverlusten ist in Abb. A. 12 dargestellt. Diese Fragmentionen wurden auch direkt aus DES und IDES freigesetzt, wenn die Kollisionsenergie erhöht wurde. Die kollisionsenergieabhängige Freisetzung aus DES und IDES ist beispielhaft für die Ionen  $m/z$  132, 146 und 158 in Abb. 19 gezeigt. Bei 100 eV Kollisionsenergie handelte es sich dort um die dominierenden Ionenspezies (vgl. Abb. A. 13 A und Abb. A. 13 B).



**Abb. 20: CID-Pseudo- $\text{MS}^3$ -Spektrum von  $m/z$  262 freigesetzt aus DES aufgenommen mittels nanoESI-QqTOF MS**

Die Strukturformel des Vorläuferions  $m/z$  262 ist ebenfalls abgebildet. Modifiziert nach Schröder *et al.* (227).

Zur Bestimmung der exakten Masse, um daraus die Elementarzusammensetzung abzuleiten, wurde darüber hinaus die Probe mittels HCD an dem Orbitrap Velos Pro MS untersucht und die Fragmentationen hochaufgelöst in dem Orbitrap-Massenanalysator mit einer Massengenauigkeit kleiner als 5 ppm analysiert (Kap. 3.3.4). Die Analyse ergab, dass die entstehenden Fragmentationen jeweils die Summenformel  $C_xH_yN$  aufwiesen. Die exakten Summenformeln der abundantesten Fragmentationen bei erhöhten Kollisionsenergien sind in Tab. 2 gezeigt. Die relativen Intensitäten der Fragmentationen von DES und IDES waren sich bei diesen erhöhten Kollisionsenergien so ähnlich, dass es nicht mehr möglich war, diese zu unterscheiden. Es zeigte sich, dass die Fragmentationen zwischen 9 und 13 Kohlenstoffatome enthielten und in der Anzahl der Wasserstoffatome schwankten.

**Tab. 2: Elementare Zusammensetzung der bei 100 eV mittels ESI-LTQ-Orbitrap Velos Pro MS beobachteten HCD-Fragmentationen von DES/IDES**

$m/z$ (1+), beobachtet	$m/z$ (1+), berechnet	$\Delta m$ [ppm]	Summenformel
<b>188,1429</b>	188,1434	2,7	$[C_{13}H_{18}N]^+$
<b>186,1276</b>	186,1277	0,5	$[C_{13}H_{16}N]^+$
<b>184,1120</b>	184,1121	0,5	$[C_{13}H_{14}N]^+$
<b>182,0959</b>	182,0964	2,7	$[C_{13}H_{12}N]^+$
<b>174,1276</b>	174,1277	0,6	$[C_{12}H_{16}N]^+$
<b>172,1118</b>	172,1121	1,7	$[C_{12}H_{14}N]^+$
<b>170,0962</b>	170,0964	1,2	$[C_{12}H_{12}N]^+$
<b>160,1118</b>	160,1121	1,9	$[C_{11}H_{14}N]^+$
<b>158,0960</b>	158,0964	2,5	$[C_{11}H_{12}N]^+$
<b>156,0806</b>	156,0808	1,3	$[C_{11}H_{10}N]^+$
<b>146,0962</b>	146,0964	1,4	$[C_{10}H_{12}N]^+$
<b>144,0805</b>	144,0808	2,1	$[C_{10}H_{10}N]^+$
<b>134,0962</b>	134,0964	1,5	$[C_9H_{12}N]^+$
<b>132,0805</b>	132,0808	2,3	$[C_9H_{10}N]^+$
<b>130,0649</b>	130,0651	1,5	$[C_9H_8N]^+$

#### 4.2.2.2 Kollisionsinduzierte Dissoziation der Derivate von Desmosin und Isodesmosin

Weitere DES/IDES-enthaltene Verbindungen wurden benötigt, um zu überprüfen, ob die oben erwähnten Fragmentationen auch dann bei erhöhten Kollisionsenergien freigegeben werden, wenn die vier Amino- und Carboxylgruppen modifiziert sind. Zu diesem Zweck wurden

verschiedene, ungeladene Modifikationen an den funktionellen Gruppen eingefügt (siehe 3.2.1). Gemeinsam war allen, dass es sich bei dem Produkt um derivatisiertes DES/IDES handelte, das nach wie vor eine intrinsische positive Ladung trug. Aus diesem Grund entsprach das einfach geladene Vorläuferion, wie bei DES/IDES auch, der monoisotopischen Masse. Die kollisionsinduzierte Fragmentierung von Fmoc-DES/Fmoc-IDES ( $M^+$  1414,5595) führte zu Fragmentionen, die sich dadurch auszeichneten, dass sich sukzessiv die Fmoc-Gruppen als Neutralverluste abspalteten, was wiederum die Bildung von freiem DES/IDES zur Folge hatte, das nach obigen Regeln weiter dissoziierte. Wurde die Ladung auf die Fmoc-Gruppe übertragen, hatte das die Bildung der markanten Fragmentionen bei  $m/z$  178 und 179 zur Folge. Die Fragmentierung der anderen Derivate PrCl-DES/PrCl-IDES ( $M^+$  1038,6221), Pr-DES/Pr-IDES ( $M^+$  750,3920) und BuOH-DES/BuOH-IDES ( $M^+$  750,5375) zeichnete sich durch Neutralverluste kleiner Moleküle an den modifizierten funktionellen Gruppen aus. So führte die Dissoziation von BuOH-DES/BuOH-IDES beispielsweise zu Fragmentionen, die sich durch kombinierte Neutralverluste von 1-Buten, CO und  $NH_3$  auszeichneten. Weiterhin konnte für alle Derivate ebenfalls die Dissoziation der  $C_\alpha$ -N-Bindung beobachtet werden. Bei einer Kollisionsenergie von 30 eV ergaben sich für alle beobachteten Derivate komplexe Fragmentspektren. Eine Erhöhung der Kollisionsenergie auf Werte über 100 eV führte trotzdem zu der Bildung der gleichen Fragmentionen, wie sie auch bei freiem DES/IDES bei höheren Kollisionsenergien beobachtet wurden. Als Beispiel sind die Fragmentspektren von Pr-DES/Pr-IDES bei 110 eV in Abb. A. 13 C und Abb. A. 13 D gezeigt.

#### 4.2.2.3 Kollisionsinduzierte Dissoziation von *in vitro* quervernetzten und linearen Peptiden

Die Tatsache, dass sowohl freies DES/IDES als auch deren Derivate bei erhöhten Kollisionsenergien die gleichen für nicht quervernetzte Peptide unüblichen Fragmentationen freigaben, führte zu der Frage, ob dies auch der Fall ist, wenn DES/IDES Teil eines Peptides ist. Deswegen wurde die Dissoziation eines *in vitro* quervernetzten DES-enthaltenden Peptides mit acetylierten N-Termini (Ac-) und der Sequenz Ac-AAAKKAAAKKAA\_Ac-AAAKKAAAKAA\_Ac-AAAKKAAAKAA (Aminosäuren, die Teil des DES-Ringes sind, sind unterstrichen), hergestellt wie in Heinz *et al.* (223) beschrieben, analysiert. Das N-terminal liegende Lysin war jeweils zu Allysin modifiziert worden, um die Ausbildung von DES zu induzieren. Die Dissoziation bei Energien, wie sie normalerweise zur Peptidsequenzierung verwendet wurden, führte nicht zu der Bildung der Reporterionen, sondern zur Bildung übli-

cher b- und y-Ionenserien, wie in Abb. A. 14 gezeigt. Bei erhöhten Kollisionsenergien führte die Dissoziation zu den gleichen Fragmentionen wie bei freiem und derivatisiertem DES/IDES (vgl. Abb. A. 13 E). Als Negativkontrolle wurden 314 lineare Peptide, freigesetzt aus TE durch PE, in einem LC-MS-Experiment mittels nanoESI-QqTOF MS untersucht, um die Möglichkeit auszuschließen, dass die beobachteten Ionen auch aus diesen freigesetzt werden können. Allerdings führte die Dissoziation dieser bei höheren Kollisionsenergien lediglich zur Bildung von Immoniumionen der enthaltenen Aminosäuren und Ionen, die mit diesen verwandt sind wie z.B. interne Fragmente. Fragmentspektren von zwei linearen Peptiden bei höheren Kollisionsenergien sind beispielhaft in Abb. A. 13 G und Abb. A. 13 H gezeigt.

### 4.2.3 Entwicklung einer Methode zur Identifizierung DES/IDES-enthaltender Peptide

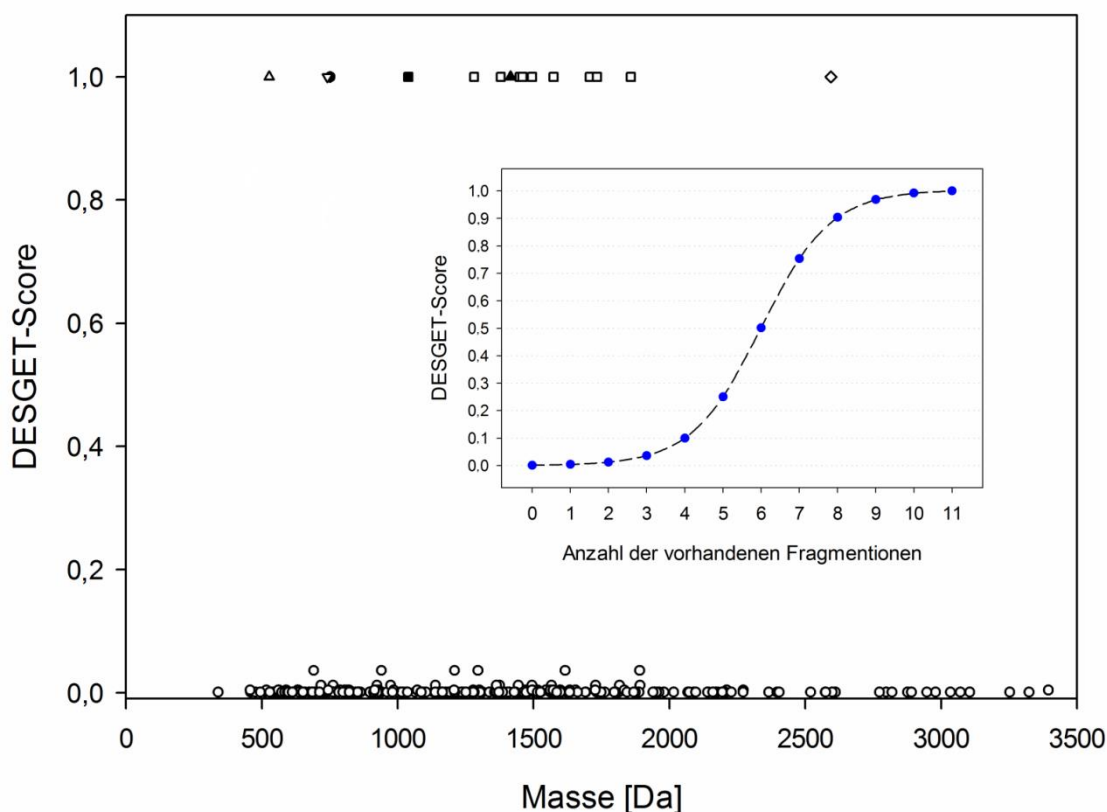
#### 4.2.3.1 DESGET-Algorithmus zur Unterscheidung linearer und tetrafunktional quervernetzter Peptide

Die Tatsache, dass freies DES/IDES und Moleküle, die DES/IDES enthalten, Ionen freigaben, die nicht durch lineare Peptide freigegeben wurden, führte zu der Hypothese, dass sich durch einen Algorithmus, der die Abundanz dieser Ionen innerhalb eines Fragmentspektrums berücksichtigt, lineare von tetrafunktional quervernetzten Peptiden unterscheiden lassen sollten. Zu diesem Zweck wurde folgender Algorithmus entwickelt, der die Abundanz der elf Reporterionen berücksichtigt:  $m/z$  130, 132, 144, 146, 156, 158, 160, 170, 172, 182, 186 (vgl. Kap. 4.2.2). Die Anzahl der Ionen  $n$  mit dem entsprechenden Masse-zu-Ladung-Verhältnis, die mindestens 5 % der Basispeakintensität aufwiesen, floss nach Gleichung 5 in den DESGET-Score  $s$  ein. Dabei kann die Fehlertoleranzgrenze (in ppm) je nach verwendetem Gerät frei gewählt werden.

$$S = \frac{1,00408677}{1 + e^{-1,1(n-6)}} \quad \text{Gleichung 5}$$

Diese Sigmoidfunktion erwies sich als geeignetes Modell zur Unterscheidung von linearen und tetrafunktional quervernetzten Peptiden. Der Algorithmus arbeitete wie folgt: Zunächst wurden die Tandem-MS-Spektren eingeladen und die Höhe des Basispeaks bestimmt. Anschließend wurden alle anderen enthaltenen Peaks in Relation dazu normalisiert. Die Ionen wurden nun mit der Produktionenmaske abgeglichen, die aus den elf Reporterionen bestand.

Nur in dem Fall, dass ein Ion einen Wert von mindestens 5 % der Basispeakintensität aufwies, wurde dieser berücksichtigt. Darauf aufbauend wurde mithilfe der Sigmoidfunktion der Score errechnet und ausgegeben. Der Score kann Werte zwischen null (kein Reporterion im Spektrum vorhanden) bis eins (alle elf Reporterionen vorhanden) annehmen. Da in niedrig aufgelösten Spektren niedriger Signalintensität chemisches Rauschen fälschlicherweise als ein Signal mit zufälligerweise übereinstimmenden  $m/z$ -Wert interpretiert werden könnte, kann so ausgeschlossen werden, dass diese Spektren falsch identifiziert werden. Um die Robustheit des Algorithmus zu überprüfen, wurde der DESGET-Score sowohl für die CID/HCD-Spektren der DES/IDES-enthaltenen Substanzen berechnet als auch für den realen Testdatensatz aus 314 linearen Peptiden (vgl. Kap. 4.2.2). Dies ist in Abb. 21 gezeigt.



**Abb. 21: DESGET-Scores zur Unterscheidung von linearen und tetrafunktional quervernetzten Peptiden**  
 DESGET-Scores für DES/IDES (aufrechtes weißes Dreieck), Pr-DES/Pr-IDES (umgekehrtes weißes Dreieck), BuOH-DES/BuOH-IDES (schwarzer Kreis), PrCl-DES/PrCl-IDES (schwarzes Quadrat), DES/IDES-enthaltende Peptide aus bovinem Aortenelastin verdaut mit PE (weiße Quadrate), Fmoc-DES/Fmoc-IDES (aufrechtes schwarzes Dreieck) und ein *in vitro* quervernetztes DES/IDES-enthaltendes Peptid (gekipptes weißes Quadrat). Lineare Peptide gewonnen aus TE sind als weiße Kreise dargestellt. Weiterhin ist als Kasten eingefügt der Zusammenhang zwischen erhaltenem DESGET-Wert und der Anzahl identifizierter Fragmentationen. Modifiziert nach Schröder *et al.* (227).

Wie deutlich zu sehen ist, lassen sich die erhaltenen Werte klar voneinander unterscheiden. Kein lineares Peptid erhielt einen Score höher als 0,05. Alle DES/IDES-enthaltenen Ver-

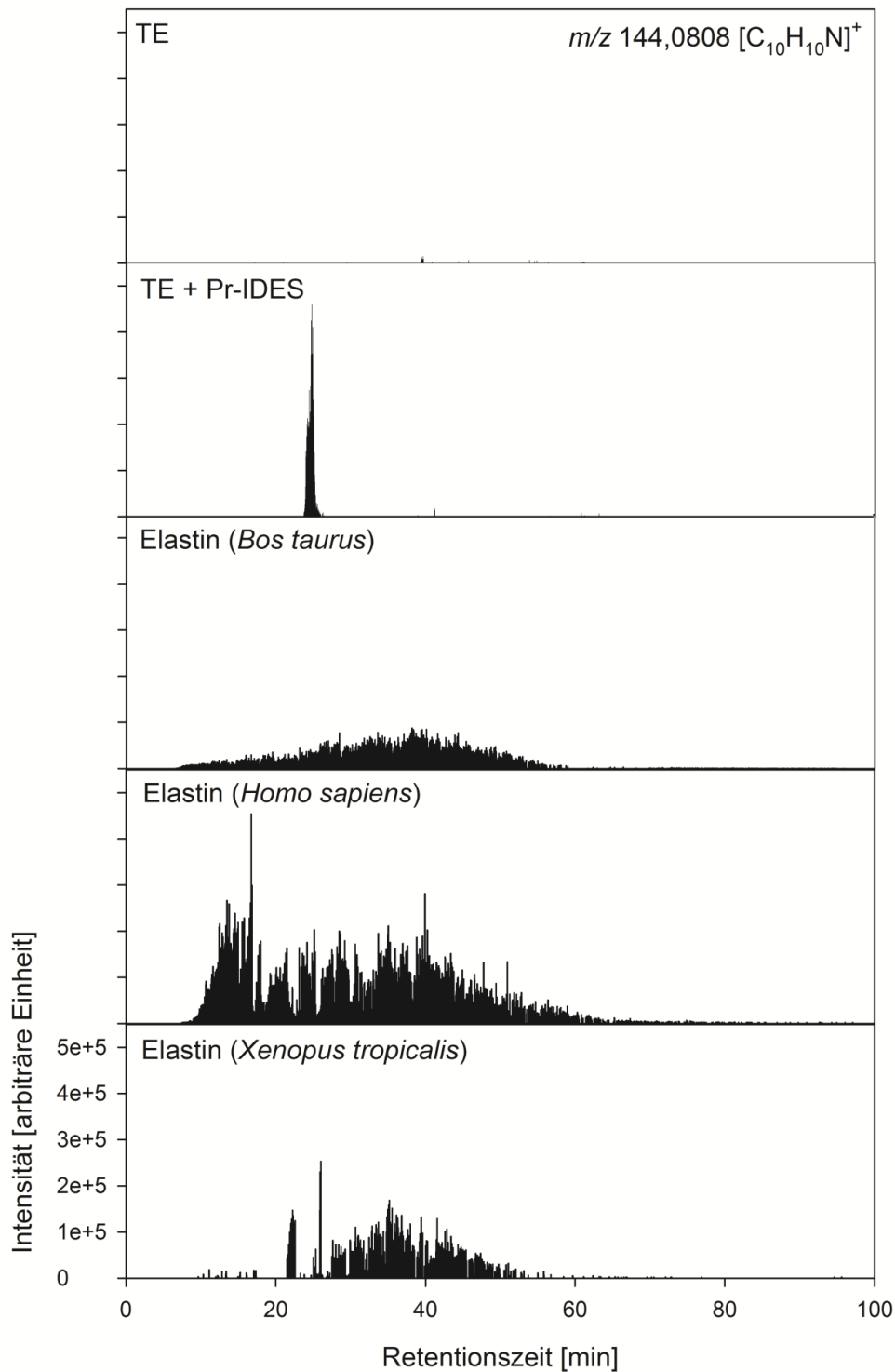
bindungen erhielten einen Score von 1, womit eine eindeutige Unterscheidung möglich war. Als Konsequenz wurde untersucht, ob sich mithilfe des Algorithmus auch in proteolytisch abgebautem, nativem Elastin DES/IDES-enhaltende Peptide finden lassen. Dazu wurde bovines Aortenelastin verwendet (siehe Kap. 3.1.5), das entsprechend Kap. 3.2.5 mit PE verdaut worden war. Bovines Elastin wurde deswegen zunächst verwendet, da es zu Elastin aus *HSA* eine hohe Sequenzidentität aufweist, aber in größeren Mengen als humanes Elastin verfügbar war. Die Analyse erfolgte auch hier mittels nanoHPLC-nanoESI-QqTOF MS unter Verwendung höherer Kollisionsenergien. Das Kollisionsenergieprofil wurde so eingestellt, dass jede Peptidbindung der entsprechenden Vorläuferionen so gut wie vollständig dissoziiert wurde und somit keine Fragmentationen oberhalb von  $m/z$  210 mehr beobachtet wurden.

Das entsprach je nach Ladung und  $m/z$ -Wert Energien von 80 eV bis 180 eV. Wie in Abb. 21 zu sehen ist, konnten mithilfe dieser DDA-Methode in Kombination mit dem sich anschließenden DESGET-Algorithmus neun Peptide identifiziert werden, die einen Wert von 1 aufwiesen. Diese wiesen Massen von 1250 Da bis 1900 Da auf. Das Fragmentspektrum des doppelt geladenen Ions bei  $m/z$  725 mit den typischen Reporterionen ist beispielhaft in Abb. A. 13 F gezeigt. Die exakte Identifizierung dieser tetrafunktional quervernetzten Peptide basierend auf Fragmentspektren, die bei einer 35 % NE an dem Orbitrap Velos Pro MS aufgenommen wurden, wird in Kap. 4.3.3 behandelt. Die Peptide wiesen außerdem allesamt sehr niedrige Retentionszeiten auf, sodass nun nach einer Methode gesucht wurde, das Retentionsverhalten aller DES/IDES-quervernetzten Peptide zu bestimmen und eine Aussage darüber treffen zu können, ob diese innerhalb der RP-LC zu einer bestimmten Zeit bevorzugt eluieren.

#### **4.2.3.2 LC-MS-Methode zur globalen Identifizierung tetrafunktional quervernetzter Peptide**

Da gängige DDA-Experimente keinen Aufschluss über die Abundanz von DES/IDES-Peptiden in hydrolysiertem Elastin geben, wurde nach einer DIA-Methode gesucht, die es erlaubt, DES-Peptide global innerhalb eines LC-MS-Experimentes zu identifizieren. Dies erlaubt eine semiquantitative Aussage über den Gehalt von DES/IDES innerhalb eines proteolytischen Verdaus. Auch dies erfolgte auf Basis der in Kap. 4.2.1 identifizierten Fragmentationen, die aus DES/IDES-Peptiden bei höheren Kollisionsenergien freigesetzt werden. Je höher die Massengenauigkeit des verwendeten Gerätes ist, desto verlässlicher ist das Ergebnis. Gerade in Hinblick auf die Analyse der Reporterionen sollte sichergestellt werden, dass es sich ausschließlich um Ionen mit besagter Summenformel handeln konnte. Um Fragmentationen mit

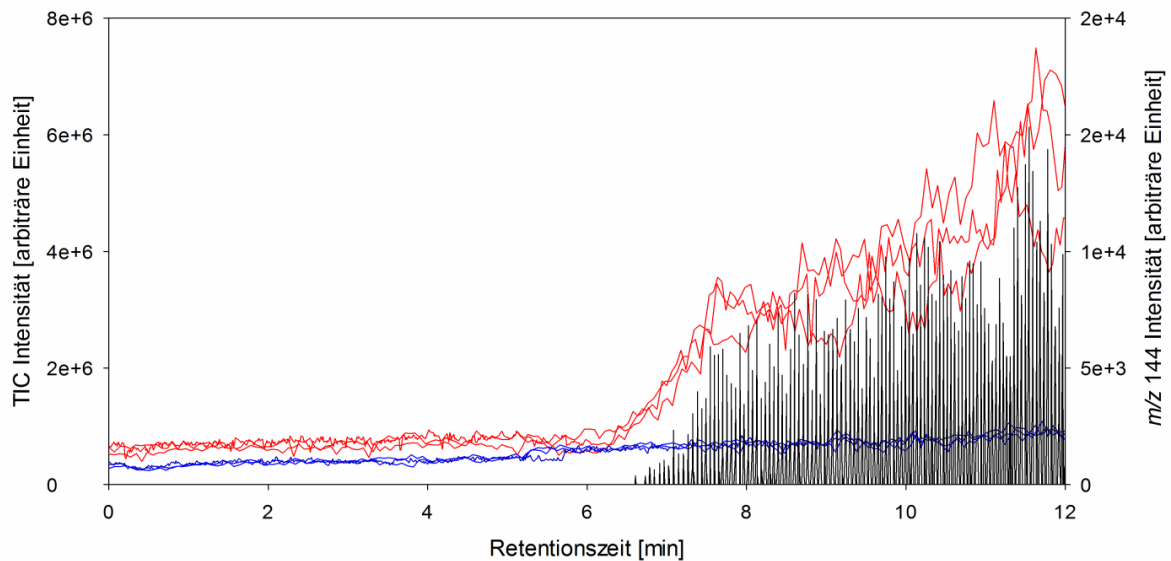
hoher Massengenauigkeit detektieren zu können, wurden die LC-MS-Methode deshalb an dem Orbitrap Velos Pro MS entwickelt und Fragmentionen, erzeugt durch HCD, in dem Orbitrap-Massenanalysator identifiziert. Die Methode zielt darauf ab, innerhalb von 100 Th-Fenstern (mit einer Zykluszeit von 2,6 s) von  $m/z$  350 bis  $m/z$  1250 alle dort vorhandenen Ionen gleichzeitig zu selektieren und mit 95 % NE zu fragmentieren. Dies erlaubt auch dort die vollständige Dissoziation aller enthaltenen Vorläuferionen und ggf. die Freisetzung der DES/IDES-spezifischen Ionen (vgl. Abb. 14 und Kap. 3.3.5). Als Negativkontrolle wurde mit PE verdautes TE verwendet. Als Positivkontrolle diente Pr-IDES, das als Standard in einen solchen proteolytischen Verdau gegeben wurde. Weitere Substrate waren proteolytische Verdau mittels PE von humanem und bovinem Aortenelastin sowie vom Lungenelastin aus *XTR*. Es sollte auf Basis des abundantesten Fragmentions  $m/z$  144,0808 ( $C_{10}H_{10}N^+$ ) mit einer Fehlertoleranz von 5 ppm untersucht werden, wie hoch die Abundanz von DES/IDES-Peptiden ist. Da eine Freisetzung keines der Ionen aus linearen Elastinpeptiden möglich ist (vgl. Abb. 21), ist es bei hochauflösenden Analysatoren wie dem Orbitrap-Massenanalysator ausreichend, dies an einem Fragmention zu zeigen. Der DESGET-Algorithmus berücksichtigt jedoch alle elf Ionen, um die Analyse auch bei weniger genauen Analysatoren wie älteren QqTOF-Instrumenten durchzuführen. Wie aus Abb. 22 ersichtlich wird, wurde bei verdaulichem TE mittels dieser LC-Tandem-MS-Methode dieses Fragmention aus keinem Peptid freigesetzt. Bei der Analyse von TE mit  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  Pr-IDES konnte hingegen ein scharf eluierender Peak von  $m/z$  144,0808 bei einer Retentionszeit von 28 min beobachtet werden, der Pr-IDES zuzuordnen war. Proteolytische Verdau von humanem und bovinem Elastin zeigten eine deutliche Abundanz dieses Fragmentions. So konnte dort bereits nach 6 min Retentionszeit (dies entspricht 5 % RP B Laufmittel) beobachtet werden, dass Peptide eluieren, die dieses Fragmention freisetzen. Dies ist vergrößert für Elastin aus *HSA* in Abb. 23 dargestellt. Interessanterweise wurden lineare Peptide durch die PEAKS-Software dort jedoch erst nach 12 min identifiziert. Wie eindeutig zu erkennen, eluierten bei dem TE-Verdau zu diesem Zeitpunkt noch keine Peptide. Dies ist anhand des konstant bleibenden TIC zu erkennen, während der von humanem Elastin ab 6 min anstieg. Um auszuschließen, dass es sich um Sprayinstabilitäten handelte, wurden die Messungen von jeweils drei Replikaten randomisiert durchgeführt.



**Abb. 22:** Abundanz des C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sup>+</sup>-Fragmentions in proteolytischen Verdauen von TE und Elastin isoliert aus HSA, BTA und XTR aufgenommen an dem nanoHPLC-nanoESI-LTQ-Orbitrap Velos Pro MS

Wie aus Abb. 23 weiterhin deutlich wird, stieg die Abundanz von  $m/z$  144,0808 in gleichem Maß wie der TIC, was nahe legt, dass dieser Anstieg ganz oder fast ausschließlich durch die Elution von DES/IDES-enhaltenden Peptiden zu erklären ist.





**Abb. 23: Retentionsverhalten von tetrafunktional quervernetzten Peptiden aus humanem Aortenelastin akquiriert am nanoHPLC-nanoESI-LTQ-Orbitrap Velos Pro MS**

Der TIC ist auf der linken Achse für proteolytische PE-Verdaue aus TE (blau) und humanem Aortenelastin (rot) aufgetragen. Auf der rechten Achse ist das im Tandem-MS-Modus bei 95 % NE freigesetzte Ion  $m/z$  144,0808 aufgetragen. Dies ist für Elastin als schwarzer Balken dargestellt. Bei TE wurde in diesem Zeitfenster dieses Fragmentation nicht beobachtet. Es handelt sich bei beiden Datensätzen um dreifache technische Replikate.

Dass tetrafunktional quervernetzte Peptide schon extrem früh eluieren, zeigen bereits die DDA-Experimente aus Kap. 4.2.1. Die frühe Elution wurde dazu genutzt, um diese spezifisch durch einen Fraktionssammler in Kombination mit einer RP-LC anzureichern und zu analysieren (vgl. Kap. 3.2.6, 4.3.3, 4.4.3). Dieses Verhalten zeigte sich nicht für Peptide, die aus Elastin von *XTR* freigesetzt wurden. Es eluierten dort zwar Peptide, die offensichtlich DES/IDES enthielten, allerdings geschah dies erst zwischen 22 min und 50 min Retentionszeit (vgl. Abb. 22). Zusammenfassend betrachtet eluierten tetrafunktional quervernetzte Peptide aus humanem und bovinem Elastin über die gesamte Länge des Gradienten, DES/IDES-Peptide aus Elastin von *XTR* nur zu späteren Zeitpunkten.

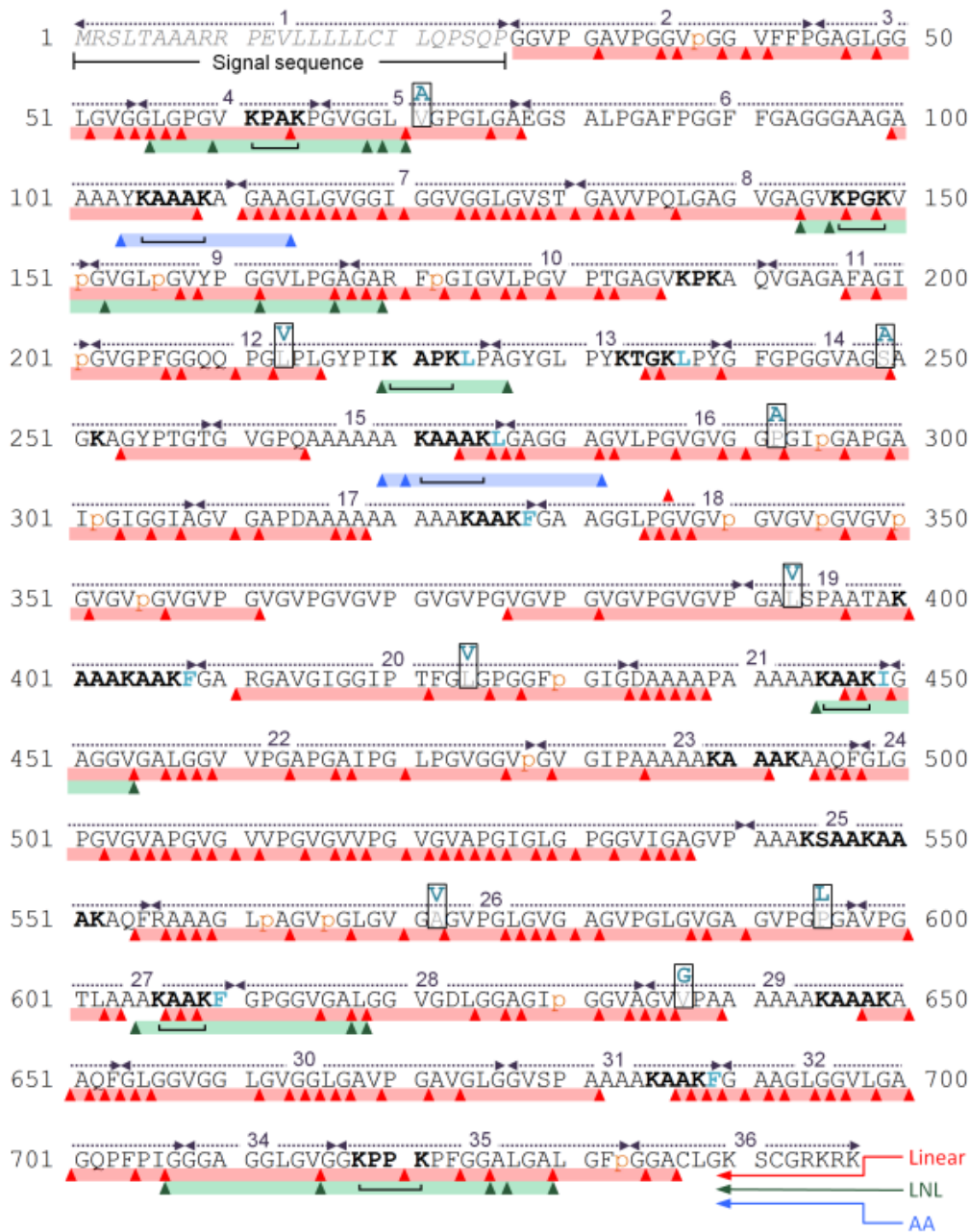
### 4.3 Molekulare Charakterisierung von Elastin isoliert aus *Bos taurus*

Elastin, das zuvor wie in Kap. 3.2.2 beschrieben, aus der Aorta einer dreijährigen Kuh der Rasse „Fleckvieh“ isoliert worden war, wurde massenspektrometrisch untersucht, um auf molekularer Ebene zu untersuchen, inwiefern die verschiedenen Lysinreste in Quervernetzungen involviert sind. Bovines Elastin wurde zunächst als Substrat gewählt, da es in großer Menge leicht verfügbar ist und eine hohe Sequenzidentität zum Elastin vom Menschen aufweist (vgl. Abb. A. 1). Anhand dessen sollte überprüft werden, ob es möglich ist mithilfe von MS und den entwickelten Methoden quervernetzte Peptide in großem Umfang zu detektieren. Die Quervernetzungsmotive in bovinem Elastin (IF 1) setzen sich wie beim Menschen aus den fünf N-terminal liegenden KP- und elf KA-Domänen zusammen. Im Unterschied zu humanem Elastin ist nahe dem C-Terminus die KP-Domäne 35 vorhanden. Das Quervernetzungsmotiv lautet dort KPPK, wie es auch in der TE-Sequenz von *XTR* mehrfach vorhanden ist. Die Analyse des Elastins erfolgte nach proteolytischem Verdau mittels PE. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte nanoLC-gekoppelt an dem nanoESI-Orbitrap Fusion Tribrid MS (vgl. Kap. 3.3.6) sowie ggf. nach vorheriger Fraktionierung wie in Kap. 3.2.6 beschrieben.

#### 4.3.1 Lineare Peptide

Zunächst wurde die Freisetzung linearer Peptide analysiert. Insgesamt wurden 310 lineare Peptide bei einer FDR von 1 %, bezogen auf die Peptidspektrentreffer (engl. *peptide-spectrum match*, PSM), identifiziert, die 78 % der Aminosäuresequenz von bovinem Elastin IF 1 abdecken, wobei das Signalpeptid nicht berücksichtigt wurde. Die exakte Sequenzabdeckung mit proteolytischen Spaltstellen ist in Abb. 24 angezeigt. Darin wird deutlich, dass, wie bei humanem Elastin auch, größtenteils Peptide identifiziert wurden, die aus hydrophoben Regionen freigesetzt worden waren. Identifizierte lineare Peptide waren zwischen 5 und 29 Aminosäuren lang. 561 von 721 möglichen Aminosäuren wurden als Teil linearer Peptide identifiziert. 17 Prolinreste wurden identifiziert, die partiell hydroxyliert vorlagen. Diese lagen fast ausschließlich in dem xPG-Motiv vor, wobei x Valin, Isoleucin, Leucin oder Phenylalanin sein konnte. Ein Prolinrest, P562, wurde partiell hydroxyliert innerhalb eines abweichenden Motivs gefunden. Er lag im LPA-Motiv der Domäne 26. 57 Proline wurden ausschließlich nicht hydroxyliert gefunden und weitere 12 nicht als Bestandteil linearer Peptide identifiziert. Dazu zählten auch die Proline der KP-Domänen 10 und 12 (vgl. Abb. 24). Hydroxyproline wurden

nie innerhalb von KP-Domänen identifiziert, sondern ausschließlich in hydrophoben Domänen. Lineare Peptide, die potenzielle Quervernetzungsmotive enthielten, wurden in einem deutlich geringeren Umfang detektiert als solche, die hydrophobe Domänen abdeckten.



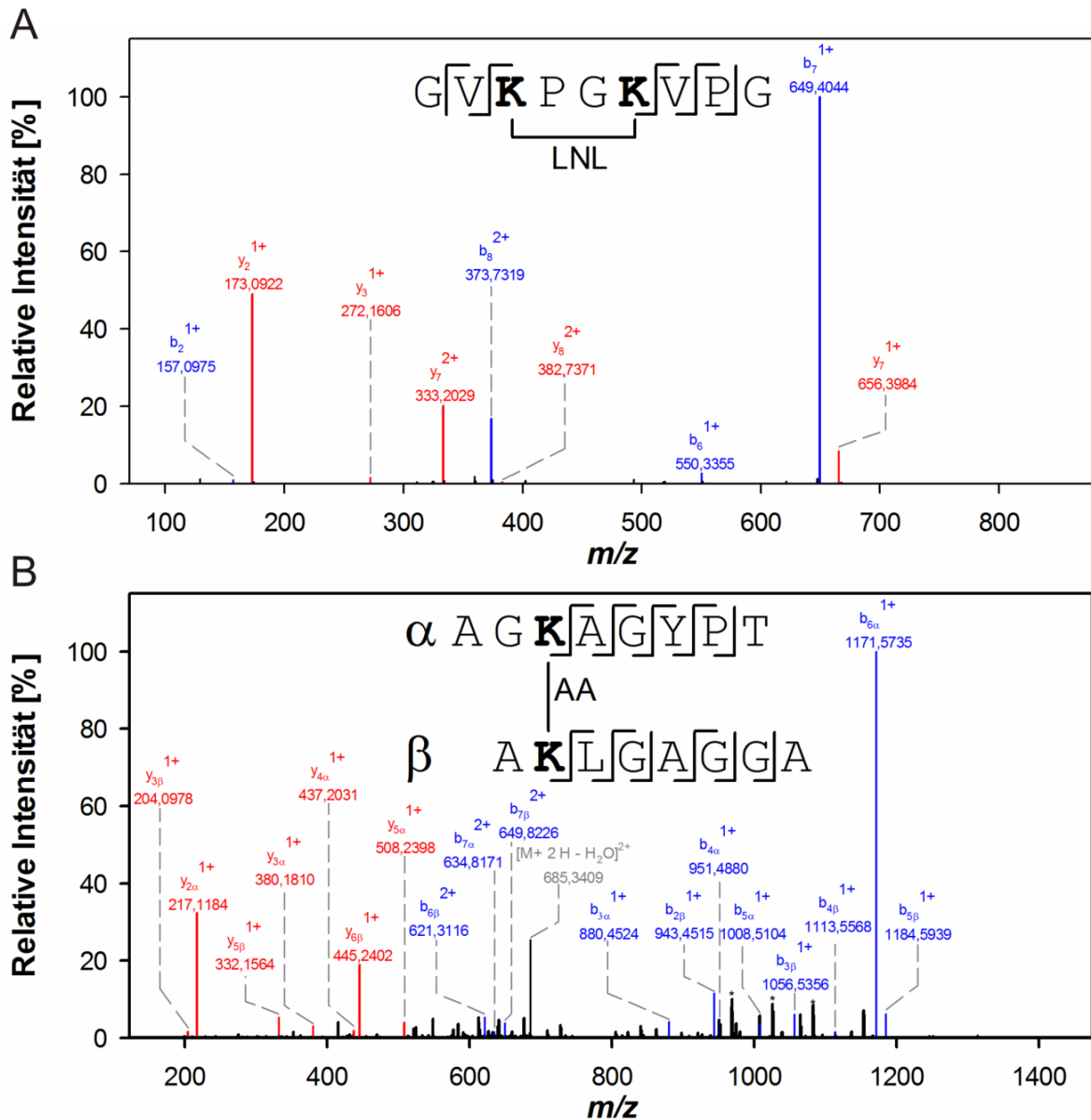
**Abb. 24: Spaltstellenanalyse von bovinem Aortenelastin (IF 1) nach proteolytischem Verdau mit PE**  
 Die jeweilige Domäne ist gestrichelt über der Sequenz gezeigt. Spaltstellen sind durch aufrechte Dreiecke markiert (lineare Peptide: rot, durch LNL intrapeptidal quervernetzte Peptide grün, durch AA intrapeptidal quervernetzte Peptide blau) und sequenzierte Regionen mit farblich entsprechenden Balken. Partiiell hydroxylierte Prolinreste sind als kleine orangefarbene Buchstaben gekennzeichnet. Aminosäureaustausche resultierend aus Basenpaaraustausche auf DNA-Ebene sind als grüner Buchstabe oberhalb der ursprünglichen Aminosäure dargestellt und schwarz umrahmt. Intrapeptidal quervernetzte Aminosäuren sind durch einen schwarzen Balken miteinander verbunden.

Detektiert wurden nicht modifizierte Lysine der KP-Domänen 4 und 8 sowie der KA-Domänen 6, 13, 15, 19, 21, 23, 27, 29, 31 und 35. Beispielhaft ist das Fragmentspektrum des linearen Peptides  $^{56}\text{LGPGVKPA}$  ( $m/z$  369,7295;  $z = 2$ ) aus der KP-Domäne 4 in Abb. A. 17 gezeigt. Damit waren die genannten Domänen zumindest teilweise nicht in Quervernetzungen involviert. In den meisten Fällen wurde das C-terminale der paarweise angeordneten Lysine identifiziert, während das N-terminale nicht detektiert wurde. Das N-terminal liegende Lysin, was in KA-Domänen meist in dem AAKAA-Motiv angeordnet ist, wurde nur für die Domänen 6 und 23 unmodifiziert gefunden. Lineare Peptide, die Lysin in modifizierter Form enthielten, wurden nicht identifiziert. Die KP-Domänen 10 und 12 und die KA-Domänen 17 und 25 wurden nicht als Bestandteil linearer Peptide identifiziert. Darüber hinaus ergab die anschließende Suche mit dem SPIDER-Algorithmus (vgl. Kap. 3.4.1), dass infolge von Basenpaaraustauschen auf DNA-Ebene neun Aminosäureaustausche, verglichen mit der kanonischen Sequenz IF 1, stattgefunden hatten (vgl. Tab. A. 3). Dabei handelte es sich in allen Fällen um Mutationen basierend auf Einzelnukleotid-Polymorphismen in der untersuchten Rasse. Diese fanden alle in hydrophoben Domänen statt und waren in allen Fällen homozygot. Neben sechs bereits beschriebenen Mutationen konnten drei neue beobachtet werden. Das C-terminal liegende RKRK-Motiv konnte nicht wiedergefunden werden. Auch die ursprünglich disulfidverbrückten Cysteinreste wurden nicht detektiert trotz vorheriger Reduzierung und Alkylierung des Substrates.

### 4.3.2 Bifunktional quervernetzte Peptide

Bifunktional quervernetzte Peptide in bovinem Aortenelastin wurden unter Nutzung der in Kap. 3.4.2 und Kap. 3.4.3 beschriebenen Methoden identifiziert. Aufgrund der großen Anzahl möglicher Kombinationen und falsch positiver Identifizierungen wurde jedes Fragmentspektrum manuell überprüft. In der vorliegenden Arbeit wurden 41 Peptide in bovinem Elastin entdeckt, die intra- oder interpeptidal durch AA oder LNL quervernetzt waren. Obwohl  $\Delta$ -LNL in den Suchalgorithmen berücksichtigt wurde, konnten keine Peptide identifiziert werden, die diese Quervernetzung aufwiesen. Bovines Elastin besitzt sechs KP-Domänen: die Domänen 4, 8, 10, 12, 13 und 35. Davon wurden die Lysine der Domänen 4, 8, 12 und 35 als intrapeptidal quervernetzt identifiziert. Dies geschah ausschließlich durch LNL (vgl. Abb. 24). Das annotierte CID-Spektrum des intrapeptidal quervernetzten Peptides  $^{144}\text{GVKPGKVPVPG}$  aus Domäne 8 ist beispielhaft in Abb. 25 A abgebildet. Darüber hinaus wurden auch die KA-Domänen 6, 15, 21 und 27 als teilweise intrapeptidal quervernetzt iden-

tifiziert (vgl. Abb. 24.). Bei den Domänen 6 und 15 handelt es sich um KAAKx-Domänen, wobei x eine sperrige Aminosäure wie Phenylalanin ist. Diese waren jeweils ebenfalls durch LNL verbunden.



**Abb. 25: CID-Spektren von einem intra- (GVKPGKVP]G (LNL)) und einem interpeptidal (AGKA-GYPT\_AKLGAGGA (AA)) quervernetzten Peptid aus bovinem Aortenelastin**

Quervernetzte Aminosäuren sind fett markiert. b-Ionen und y-Ionen sind blau bzw. rot dargestellt. Gleiches gilt für damit verwandte Ionen (interne Fragmente, H<sub>2</sub>O-, NH<sub>3</sub>-Verluste). Die entsprechenden Vorläuferionen waren bei [A]  $m/z$  411,2475;  $z = 2$  und [B]  $m/z$  694,3466;  $z = 2$ .

Bei den Domänen 21 und 27 handelt es sich um AKAAKA-Domänen. Dort sind die beiden Lysine nicht durch zwei, sondern drei Alanine getrennt und sind darüber hinaus nicht C-terminal von einer sperrigen Aminosäure flankiert. Die Lysine in diesen beiden Domänen

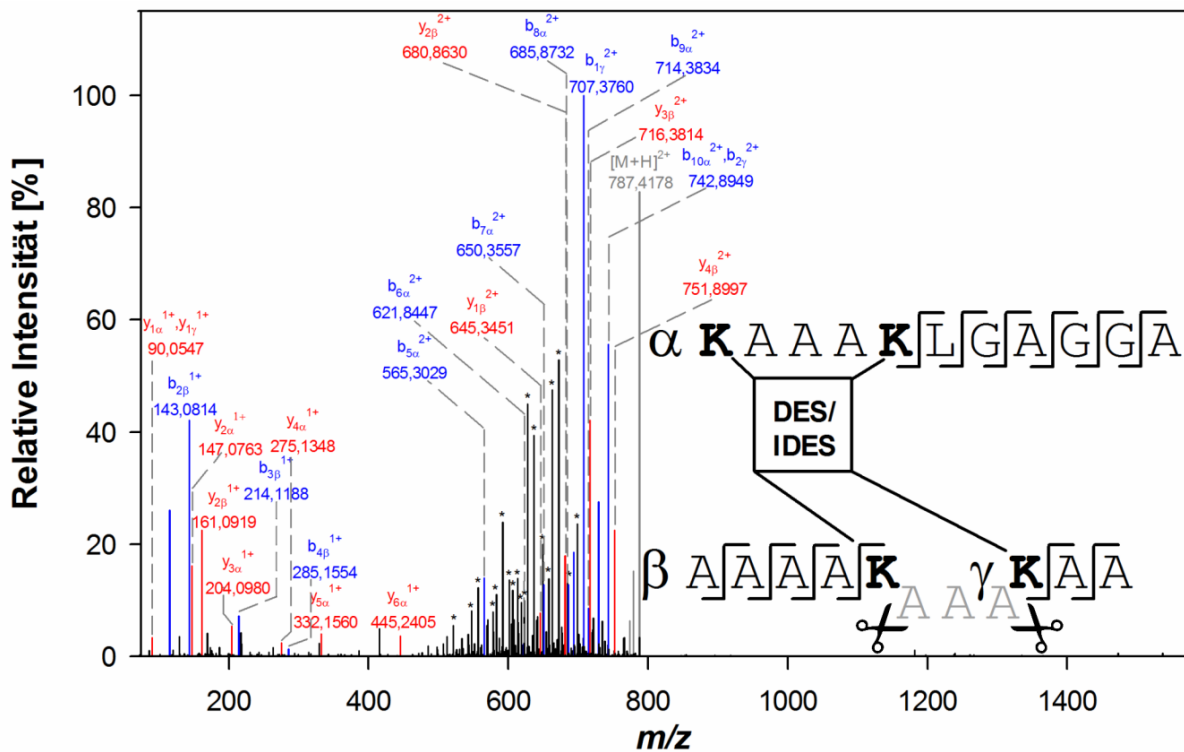
waren durch AA miteinander verbunden. Alle intrapeptidal quervernetzten Peptide sind in Tab. A. 4 abgebildet. Darüber hinaus wurden 26 Peptide identifiziert, die interpeptidal quervernetzt waren. Diese sind in Tab. A. 5 dargestellt. Als eindeutig miteinander quervernetzt wurden folgende Domänen identifiziert: Domäne 4 mit Domäne 12, Domäne 14 mit Domäne 6 sowie Domäne 15, sowie Domäne 27 mit Domäne 12. Zu den weiteren Domänen, die interpeptidal durch AA oder LNL quervernetzt waren, zählten die KP-Domäne 8 sowie die KA-Domänen 21, 25, 27 und 31. In diesen Fällen war jedoch das mit diesen vernetzte Peptid sehr kurz und bestand neben dem involvierten Lysin nur aus wenigen Aminosäuren oder gar nur einer Aminosäure wie Alanin. Aufgrund dessen war eine eindeutige Zuordnung zu einer bestimmten Domäne dort nicht möglich.

Beispielhaft für ein interpeptidal quervernetztes Peptid in bovinem Elastin ist das annotierte CID-Spektrum des zweifach geladenen Vorläuferions  $m/z$  694,3466 dargestellt (vgl. Abb. 25 B). Bei diesem handelte es sich um das Peptid  $^{250}\text{AGKAGYPT}_{274}\text{AKAG}$  (Domänen 14 und 15). In vielen Fällen waren KP-Domänen mit KA-Domänen verbunden. Dies konnte für die KP-Domänen 4, 8, 12 und 13 eindeutig nachgewiesen werden, auch wenn die exakte KA-Domäne unbekannt bleibt. Auch viele KA-Domänen wurden identifiziert, die ihrerseits mit anderen KA-Domänen verbunden waren. Zu diesen zählten aufgrund eindeutiger Aminosäuresequenzen 6, 14, 15, 21, 25, 27 und 31. Neun der Peptide waren durch AA quervernetzt und 17 durch LNL. Meist waren Peptide, in denen die Lysine von kleinen Aminosäuren wie Alanin oder Glycin umgeben waren, durch AA vernetzt. Beispiel hierfür sind  $^{551}\text{AKAQFRAA}_{KAA}$  und  $^{250}\text{AGKAGYPT}_{108}\text{AKAG}$ . Peptide, bei denen mindestens einer der Lysinreste von großen Aminosäuren umgeben war, waren meist durch LNL miteinander quervernetzt (vgl. Tab. A. 5)

### 4.3.3 Tetrafunktional quervernetzte Peptide

Durch Fraktionierung des proteolytischen Elastinverdaus wie in Kap. 3.2.6 beschrieben, wurde ein Teil der tetrafunktional quervernetzten Peptide spezifisch angereichert (vgl. Kap. 4.2.2) und anschließend wiederum massenspektrometrisch untersucht. Vorläuferionen wurden zur Identifizierung von DES/IDES nach manueller Selektion im Vorläuferionenspektrum bei 95 eV Kollisionsenergie im HCD-Modus fragmentiert und anschließend zur Sequenzierung bei 35 eV ebenfalls im HCD-Modus. Insgesamt konnten drei Peptide identifiziert und sequenziert werden, die durch DES/IDES quervernetzt waren. Als Kriterium diente zunächst ein DESGET-Score von  $\geq 0,9$  bei 95 % NE. Alle Peptidstränge, die Bestandteil des DES/IDES-

quervernetzten Peptides waren, konnten ausschließlich KA-Domänen zugeordnet werden. Alle drei identifizierten DES/IDES-quervernetzten Peptide bestanden aus drei miteinander quervernetzten Peptiden. Die entsprechenden Sequenzen aller drei Peptide sind in Tab. A. 6 dargestellt. Alle haben gemeinsam, dass eine der Ketten eine große hydrophobe Aminosäure C-terminal zu einem Lysinrest trägt. Aufgrund dessen war es möglich zu ermitteln, dass es sich bei diesen Domänen um die Domänen 15 und 27 sowie 17 oder 31 handelt. Eine Unterscheidung zwischen den Domänen 17 und 31 war nicht möglich, da in beiden die Aminosäuresequenz KAAKFGAA vorkommt. Die anderen Peptide bestanden nur aus wenigen Alaninresten, was eine exakte Identifizierung der Domäne wiederum unmöglich macht. Das vollständig annotierte Fragmentspektrum des tetrafunktional quervernetzten Peptides KAAAKLGAGGA\_AAAAK\_KAA ist beispielhaft in Abb. 26 dargestellt.



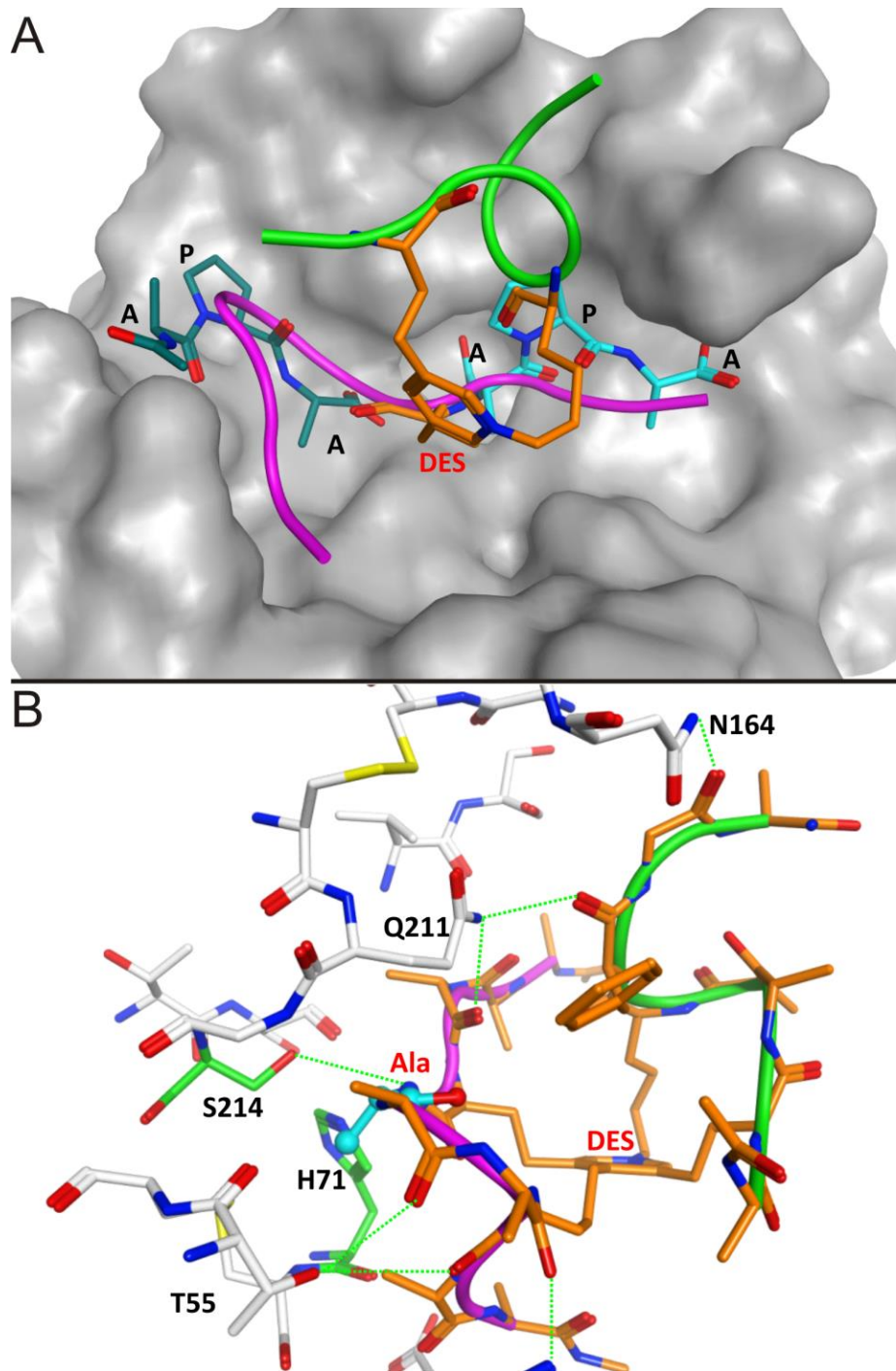
**Abb. 26: HCD-Spektrum des tetrafunktional quervernetzten Peptides KAAAKLGAGGA\_AAAAK\_KAA aus bovinem Elastin**

Quervernetzte Aminosäuren sind fett markiert. b-Ionen und y-Ionen sind blau bzw. rot dargestellt. Gleiches gilt für damit verwandte Ionen (interne Fragmente,  $H_2O$ -,  $NH_3$ -Verluste). Ionen, die durch eine Kombination von b- und y-Spaltungen entstanden sind, sind mit einem Sternchen markiert. Die durch PE möglicherweise hervorgerufene proteolytische Spaltung wird durch die Scheren gezeigt. Dabei stellen diese den Ort der Spaltung dar. Ausgeschnittene Aminosäuren sind grau gezeigt. Das entsprechende Vorläuferion war bei  $m/z$  787,4178;  $z = 2$ .

### 4.3.4 Molekulares Docking eines tetrafunktional quervernetzten Peptides mit PE

Die Tatsache, dass in bovinem Elastin drei Peptide identifiziert wurden, in denen DES/IDES drei Peptidketten miteinander vernetzt, warf die Frage auf, ob diese drei Peptide auch tatsächlich drei verschiedene Quervernetzungsdomänen repräsentierten oder nur zwei. Da zwei der drei Peptide nur aus Oligo-Alanin-Abschnitten bestehen, ist es möglich, dass es sich bei diesen beiden Peptiden um Abschnitte der gleichen KA-Domäne handelt. So ist es durchaus möglich, dass die identifizierten Sequenzen beide Teile der KA-Domänen 23 oder 29 sind. In dem Fall wäre die dritte beobachtete Peptidkette erst durch die proteolytische Spaltung von PE zwischen den beiden Lysinresten erzeugt worden. Dieses Szenario ist in Abb. 26 durch die abgebildeten Scheren dargestellt. Grau gezeigt sind dort die ausgespalteten Alaninreste. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden molekulare Docking-Simulationen zwischen dem identifizierten quervernetzten Peptid AKAAKFGAA\_AAKAAAKAAA (vgl. Tab. A. 6) und PE durchgeführt (vgl. Kap. 3.4.6). Ziel war es herauszufinden, ob die Aminosäuren, die innerhalb des DES/IDES-Gerüsts liegen, dem katalytischen Zentrum von PE (S214) nahe genug kommen können. Das Docking von 156 generierten Konformationen des Peptides AKAAKFGAA\_AAKAAAKAAA ergab drei mögliche Konformationen mit Distanzen unterhalb von 5 Å zwischen dem katalytischen Zentrum S214 von PE und dem zu spaltenden Alanin des quervernetzten Peptides. Sich anschließende MD-Simulationen über einen Zeitraum von 20 ns ergaben dabei für ein Peptid einen stabilen Komplex. Das Peptid wies hier einen RMSD (Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung, engl. *root mean square deviation*)-Wert von  $\leq 1$  Å auf und das Rückgrat der PE einen Wert von  $\leq 3$  Å (vgl. Abb. A. 15). Bei den anderen beiden möglichen Strukturen löste sich das Peptid im Zuge der Simulation von der PE ab. Wie in Abb. 27 B zu sehen, ist das Peptid dazu in der Lage mit PE sechs Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen, die den Komplex stabilisieren. Ein Vergleich mit der Kristallstruktur eines natürlich gebundenen Substrates legt nahe, dass trotz des DES-Ringes der zu spaltende Peptidstrang AAKAAAKAAA ähnlich an das aktive Zentrum binden kann wie lineare Peptide (vgl. Abb. 27 A). Das von PE nicht gebundene Peptid des DES-Ringes AKAAKFGAA nahm im Zuge der MD-Simulation eine  $\alpha$ -helikale Konformation ein. Dennoch konnte auch diese Peptidkette mit PE über eine Wasserstoffbrückenbindung interagieren (mit Q211 von PE) und dadurch den Komplex möglicherweise weiter stabilisieren. Der gespaltene Peptidstrang hatte über die Dauer der Simulation größtenteils eine *coiled-coil*-Konformation.





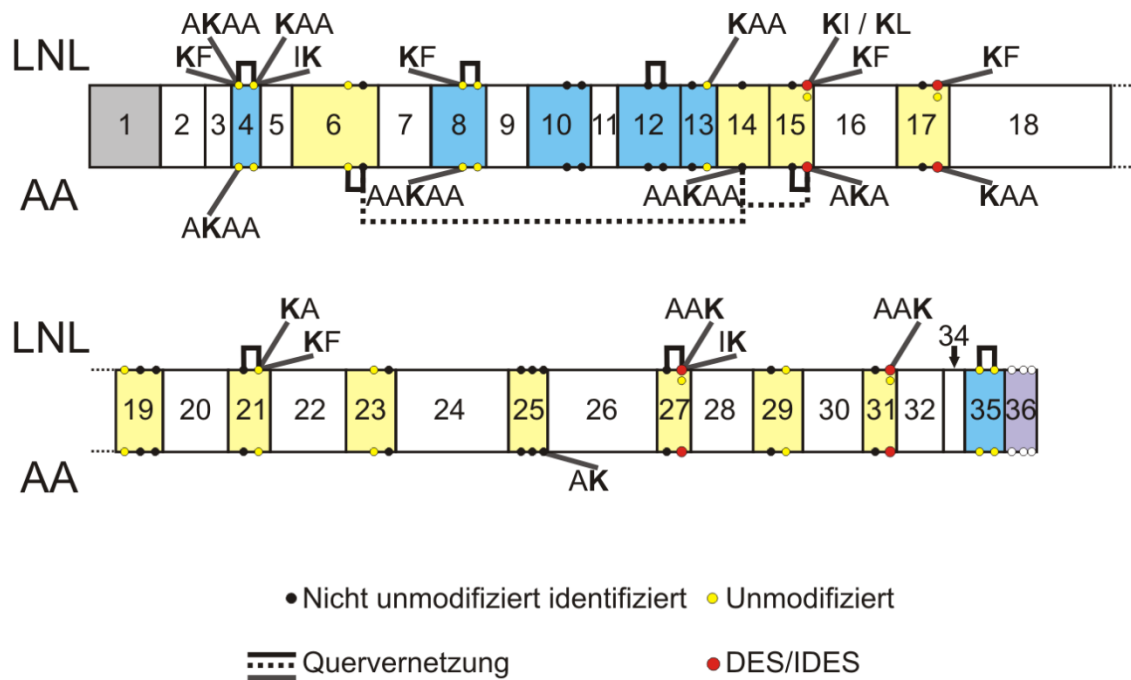
**Abb. 27: Molekulares Docking des tetrafunktional quervernetztes Peptides AKAAKFGAA AAKAAAKAAA mit dem katalytischen Zentrum S214 von PE**

[A] zeigt das Docking des Peptides, vergleichend mit einem natürlichen Substrat (Kohlenstoffatome in dunkelgrün) mit der van-der-Waals-Oberfläche von PE (gezeigt in grau). DES ist orange dargestellt und die beiden Peptidketten lila (gespalten) und grün (nicht gespaltene, dem aktiven Zentrum abgewandt). Das Modellsubstrat aus der Kristallstruktur ist dunkelgrün gezeigt. [B] Vergrößerte Einsicht in das Docking mit der katalytischen Domäne von PE. Kohlenstoffatome von PE sind in weiß, die von dem Peptid in orange gehalten. Stickstoff ist blau, Schwefel gelb und Sauerstoff rot dargestellt. Kohlenstoffatome von katalytisch aktiven Aminosäuren sind grün dargestellt. Die beiden Peptidrückgrate sind in violett (AAKAAA KAAA) und grün (AKAAKFGAA) gezeigt. Die C-terminal gespaltene Aminosäure Alanin ist in türkis dargestellt. Aminosäuren des Peptides sind rot beschriftet, wohingegen Aminosäuren von PE schwarz sind. Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb von 5 Å sind als grüne gestrichelte Linien gezeigt.

### 4.3.5 Übersicht

Lysinreste waren in bovinem Aortenelastin äußerst komplex in Quervernetzungen eingebunden. Insgesamt ergab sich ein sehr heterogenes Bild. Freie Allysine wurden nicht identifiziert. Viele Lysine lagen sowohl jeweils nicht modifiziert, intrapeptidal quervernetzt als auch interpeptidal quervernetzt vor.

Ein Beispiel hierfür ist K61 aus der KP-Domäne 4. Dieser Lysinrest wurde sowohl als Teil linearer Peptide identifiziert, intrapeptidal via LNL zu K64 aus derselben Domäne quervernetzt als auch interpeptidal quervernetzt zu AKAA und KF. Die Vernetzung zu AKAA erfolgte sowohl durch LNL als auch AA. Eine ähnlich hohe Diversität hinsichtlich der Involvierung in Quervernetzungen ist auch bei den anderen Lysinresten zu finden. Intrapeptidale Quervernetzungen durch LNL fanden dann statt, wenn die paarweise angeordneten Lysine durch zwei Aminosäuren voneinander getrennt waren. Die Vernetzung durch AA fand statt, wenn sie durch drei Aminosäuren voneinander getrennt waren. Wie bei humanem Elastin wurde auch in bovinem Elastin ein Peptid gefunden, das die Vernetzung der beiden KA-Domänen 14 und 15 miteinander zeigt. Es wurden drei Peptide identifiziert, die durch DES/IDES miteinander vernetzt waren. Interessanterweise fanden bei den KA-Domänen, die auch als Bestandteile von DES/IDES-Peptiden identifiziert worden waren, auch andere Quervernetzungen statt. So war z.B. Domäne 17/31 zusätzlich durch LNL mit KF quervernetzt. Die durchgeführten Dockingsimulationen mit PE ergaben, dass eine Spaltung der DES/IDES-Peptide bestehend aus zwei Peptidsträngen durch die verwendete PE möglich ist. Da die Spaltung innerhalb des KAAAKA-Motivs stattfand, lässt sich dieses Ergebnis auch auf die anderen beiden identifizierten tetrafunktionalen Peptide übertragen. Eine Übersicht aller identifizierten Lysinreste, deren Modifikationen und Involvierung in Quervernetzungen ist in Abb. 28 gegeben.



**Abb. 28: Identifizierte quervernetzten und nicht quervernetzten Lysinreste in bovinem Elastin**

Domänen sind entsprechend des zugehörigen Exons nummeriert. Das Signalpeptid ist grau dargestellt. Hydrophobe Domänen sind weiß, Quervernetzungsdomänen sind blau (KP-Domänen) und gelb (KA-Domänen) markiert. Lysinreste, die potenziell kovalent quervernetzt werden können, jedoch nicht identifiziert wurden, sind als schwarz ausgefüllte Kreise dargestellt. Lysinreste, die als Teil linearer Peptide identifiziert wurden, sind gelb markiert. Abhängig davon, ob identifizierte quervernetzte Peptide durch LNL oder AA vernetzt waren, ist die Annotation oben oder unterhalb der Domänenstruktur. Intrapeptidal quervernetzte identifizierte Aminosäuren sind durch einen schwarzen Balken miteinander verbunden. Interpeptidal quervernetzte Aminosäuren sind durch einen schwarzen gestrichelten Balken miteinander verbunden. Interpeptidal quervernetzte Peptide, bei denen eine eindeutige Zuordnung nicht möglich war, sind durch einen grauen Balken verbunden. Lysine, die von der sie umgebenden Aminosäuresequenz zu den identifizierten DES/IDES-Peptiden passen könnten, sind als rote Kreise dargestellt. Die C-terminal liegende Domäne 36 ist violett gefärbt. Darin enthaltene Lysinreste sind als weiße Kreise markiert.

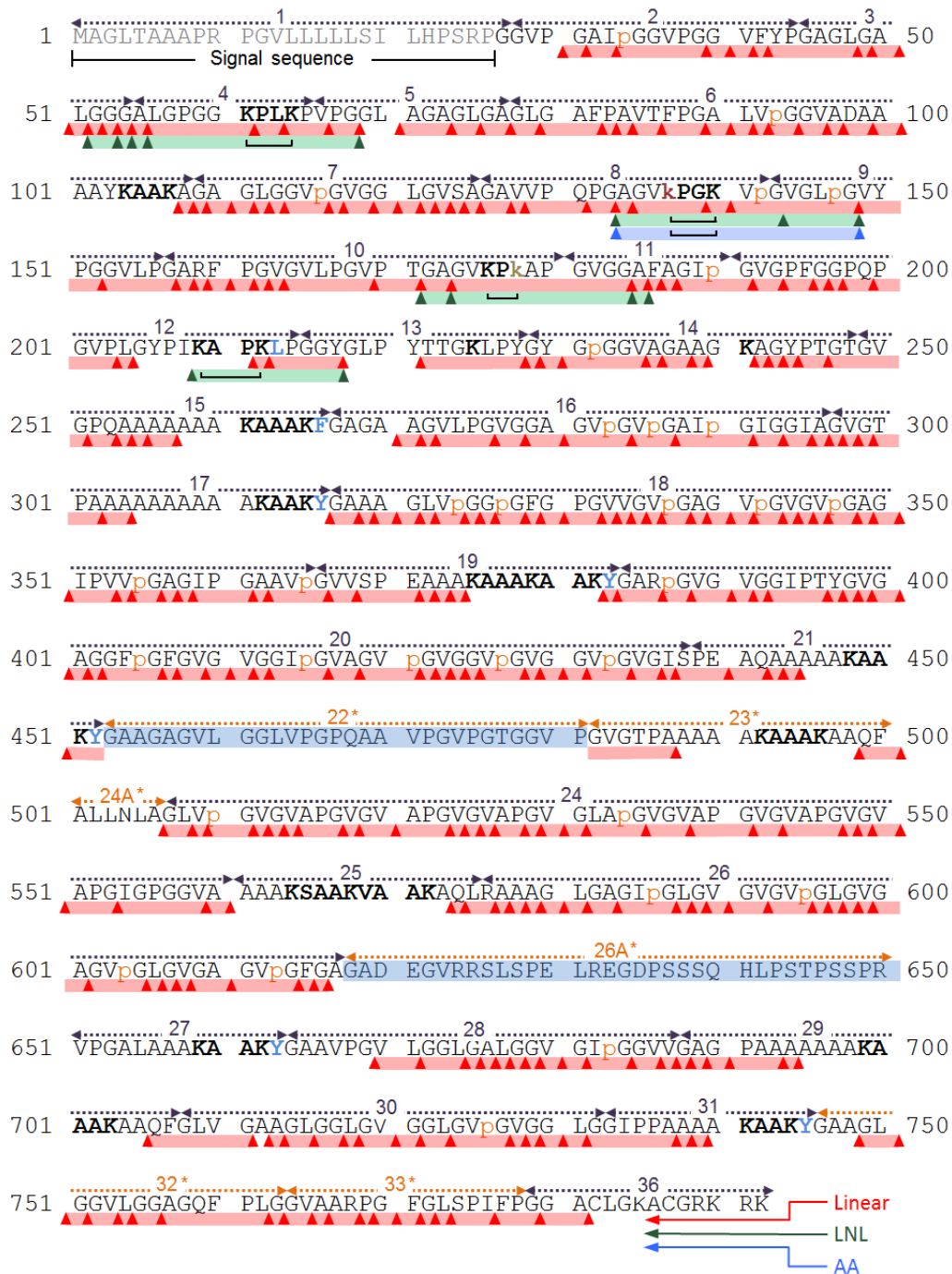
## 4.4 Molekulare Charakterisierung von Elastin isoliert aus *Homo sapiens*

Nach erfolgreicher Validierung der Methode zur massenspektrometrischen Identifizierung quervernetzter Peptide von Elastin anhand von *BTA* (vgl. Kap. 4.3) wurde anschließend humanes Elastin als zentrales Forschungsobjekt verwendet. Um auch hier auf molekularer Ebene zu untersuchen, inwiefern die verschiedenen Lysinreste in Quervernetzungen involviert sind, wurde Elastin, wie in Kap. 3.2.2 beschrieben, aus einer Aortenprobe eines 69-jährigen Probanden, die aus einer Bypass-Operation stammte, isoliert. Die Quervernetzungsmotive in humanem Elastin der IF 2 setzen sich aus fünf KP- und elf KA-Domänen zusammen (66). Nachdem isoliertes Elastin durch PE proteolytisch verdaut worden war, erfolgte die massenspektrometrische Analyse nanoLC-gekoppelt an dem nanoESI-Orbitrap Fusion Tribrid MS (vgl. Kap. 3.3.6). In einigen Fällen wurde die Probe zuvor wie in Kap. 3.2.6 beschrieben fraktioniert.

### 4.4.1 Lineare Peptide

Insgesamt wurden durch die massenspektrometrische Analyse und die nachfolgende Sequenzierung durch PEAKS bei einer FDR von 1 %, bezogen auf die Anzahl der PSMs, 540 lineare Peptide identifiziert, die Elastin zugeordnet werden konnten. Aus der Analyse der entstandenen Peptide ging hervor, dass es sich um die IF 2, in der die Domäne 22 ausgespleißt ist, handelte. Das Fehlen von Domäne 22 wurde durch ein die Domänen 21/23 umspannendes Peptid eindeutig belegt. Entstandene Peptide waren zwischen 5 und 27 Aminosäuren lang und deckten 81 % der Aminosäuresequenz von TE IF 2 ab. 564 von 698 möglichen Aminosäuren wurden als Teil linearer Peptide detektiert. Die exakte Sequenzabdeckung und zugehörige proteolytische Spaltstellen sind in Abb. 29 gegeben. Dort wird deutlich, dass die Mehrheit der freigesetzten Peptide Sequenzen abdeckt, die den hydrophoben Abschnitten zuzuordnen sind und daher nicht in Quervernetzungen eingebunden sein können. Es wurden insgesamt 28 von 86 Prolinresten als partiell hydroxyliert identifiziert. Das heißt, dass zu jedem dieser Prolinreste modifizierte und nicht modifizierte Peptide gefunden wurden. 47 Prolinreste wurden ausschließlich in der nicht modifizierten Variante identifiziert. Elf Proline wurden gar nicht identifiziert. Generell fand die Hydroxylierung ausschließlich an Prolinresten statt, die innerhalb eines xPG-Motives vorkamen. Die zu Prolin N-terminal liegende Aminosäure x konnte in diesem Fall Glycin, Valin, Leucin, Isoleucin und auch Arginin sein. Wie aus Abb. 29 er-

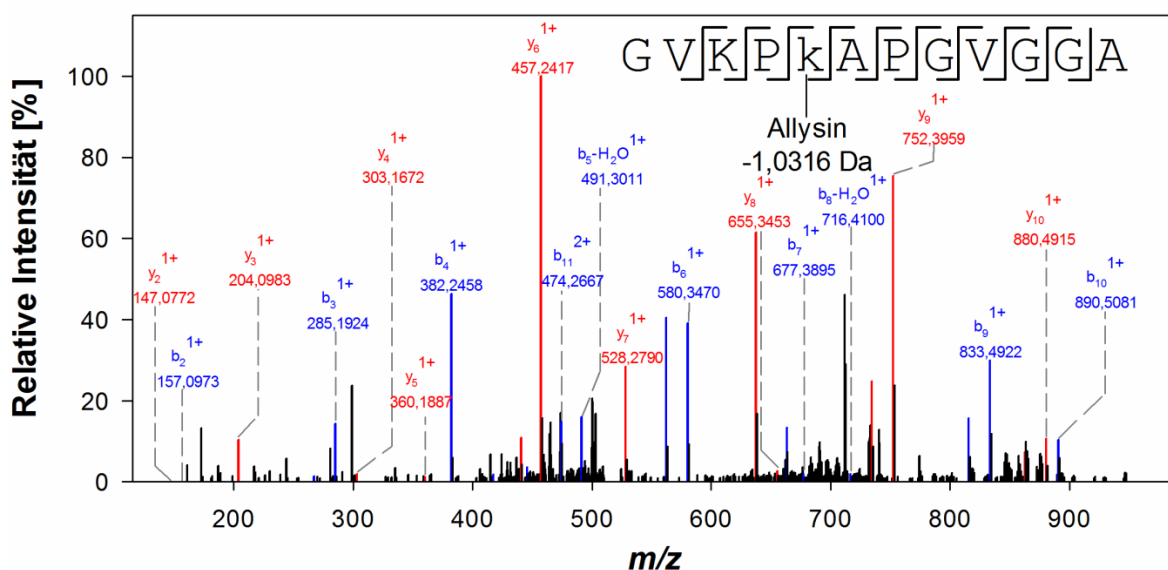
sichtlich, fand die Hydroxylierung von Prolin über die gesamte Sequenz verteilt statt. Innerhalb der KP-Domänen wurden keine hydroxylierten Prolinreste identifiziert.



**Abb. 29: Spaltstellenanalyse von humanem Aortenelastin (IF3), verdaut mit der Protease PE**

Die jeweilige Domäne ist gestrichelt über der Sequenz gezeigt. Sequenzierte Bereiche linearer Peptide sind durch hellrote Balken unterhalb der Aminosäuresequenz hervorgehoben. Die dazugehörigen Spaltstellen sind durch rote aufrechte Dreiecke markiert. Entsprechend sind durch LNL intrapeptidal quervernetzte Peptide grün und durch AA intrapeptidal quervernetzte Peptide blau gefärbt. Identifizierte Allysine sind als kleine khakifarbene Buchstaben und  $\alpha$ -Amino adipinsäure als kleine bordeauxrote Buchstaben innerhalb der Sequenz dargestellt. Partiiell hydroxylierte Prolinreste sind als kleine orangefarbene Buchstaben gekennzeichnet. Intrapeptidal quervernetzte Aminosäuren sind durch einen schwarzen Balken miteinander verbunden. Ausgespleißte Domänen sind blau markiert. Sperrige Aminosäuren, die C-terminal zu KA-Domänen liegen, sind blau dargestellt.

Lineare Peptide, die Sequenzen von Quervernetzungsmotiven abdeckten, wurden in einem deutlich geringeren Umfang detektiert. So enthielten von den 540 identifizierten Peptiden nur 30 modifizierbare Lysinreste. In Hinblick auf die KA-Domänen wurde nur K451, das der KA-Domäne 21 zuzuordnen ist, innerhalb eines linearen Peptides identifiziert. Lysine aus allen fünf KP-Domänen (4, 8, 10, 12 und 13) wurden als Bestandteil von linearen Peptiden wiedergefunden und lagen somit zumindest partiell nicht quervernetzt vor. Mit Ausnahme von K209 (Nummerierung bezogen auf die identifizierte IF 2) aus Domäne 12 wurden alle Lysinreste von KP-Domänen als Teil eines linearen Peptids identifiziert. Darüber hinaus konnte ein Lysinrest identifiziert werden, der zu Allysin modifiziert war. Dabei handelt es sich um K178 aus Domäne 10, das innerhalb des Motivs KPK vorliegt. Das annotierte CID-Spektrum des dazugehörigen Peptides  $^{174}\text{GVKP-Lya-APGVGGA}$  ( $m/z$  518,7930;  $z = 2$ ) ist in Abb. 30 dargestellt. Ein Peptid, in dem Lysin zu  $\alpha$ -Amino adipinsäure oxidiert war, wurde mit einem modifizierten Suchalgorithmus identifiziert (vgl. auch Kap. 4.5.1). Es handelte sich dabei um das Peptid  $^{128}\text{VVPQPGAGV-Aad-PG}$  aus der KP-Domäne 8. Das annotierte CID-Spektrum ist in Abb. A. 16 dargestellt.



**Abb. 30: CID-Spektrum des linearen Peptides GVKP-Lya-APGVGGA aus humanem Aortenelastin**  
b-Ionen und y-Ionen sind blau bzw. rot dargestellt. Gleiches gilt für damit verwandte Ionen (interne Fragmente,  $\text{H}_2\text{O}$ -,  $\text{NH}_3$ -Verluste). Das entsprechende Vorläuferion war bei  $m/z$  518,7930;  $z = 2$ .

Es wurden keine linearen Peptide identifiziert, die den C-terminalen Teil von IF 2 mit dem RKRK-Motiv repräsentieren. Dazu zählen auch die Cysteine der Disulfidbrücke, die ebenfalls nicht detektiert wurden. Obwohl der SPIDER-Algorithmus zur Identifizierung neu-

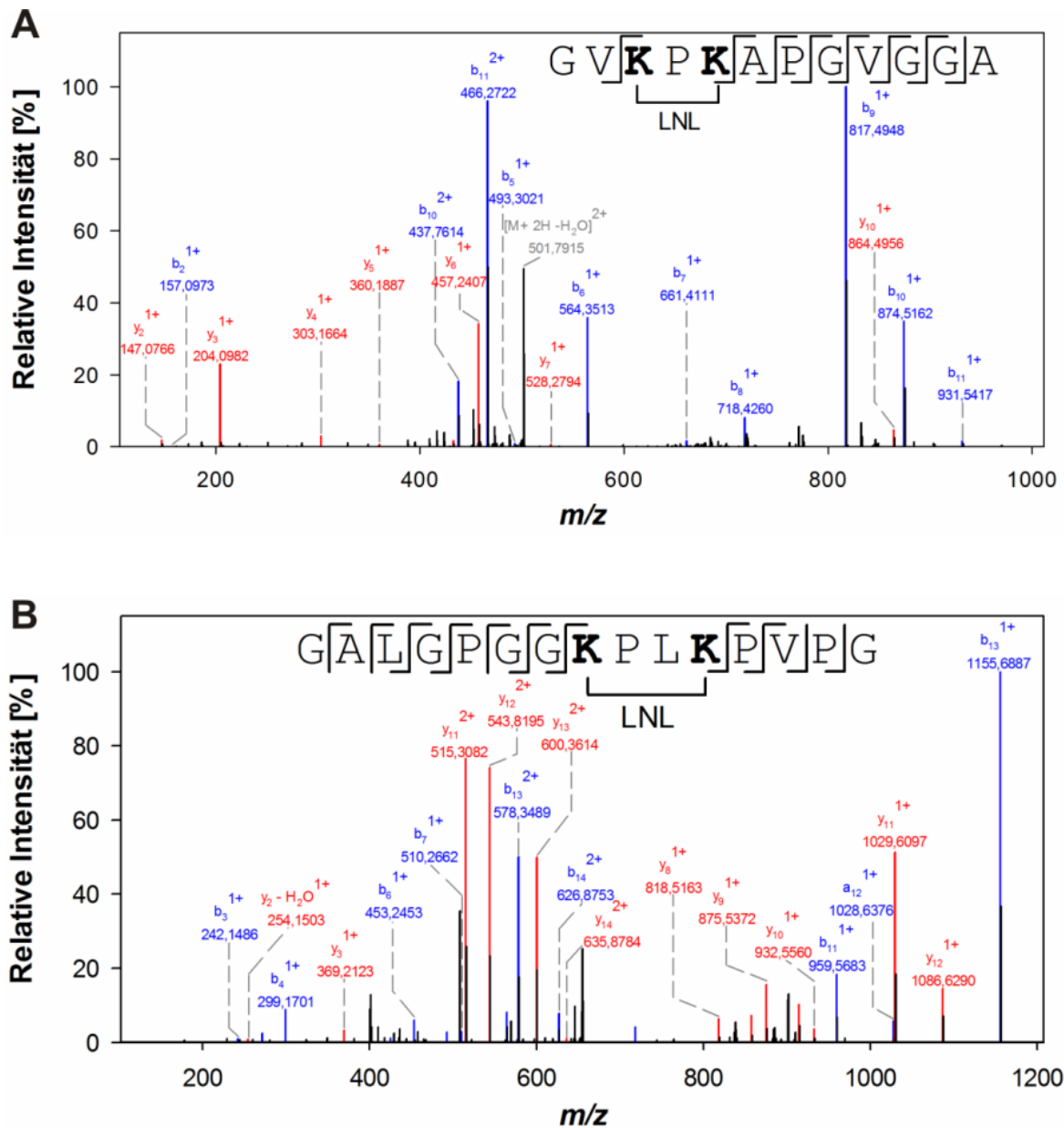
artiger Mutationen angewandt wurde, wurden keine Aminosäureaustausche, verursacht durch Basenpaaraustausche auf DNA-Ebene, beobachtet.

#### 4.4.2 Bifunktional quervernetzte Peptide

Mittels modifizierter Datenbanken in PEAKS wurde untersucht (vgl. Kap. 3.4.2), ob sich innerhalb von Quervernetzungsmotiven bifunktionale intrapeptidale Quervernetzungen ausgebildet hatten, die anschließend nicht zu DES/IDES weiter kondensiert waren. Wie in Abb. 29 zu sehen ist, wurden vier verschiedene Quervernetzungsdomänen identifiziert, innerhalb derer die paarweise auftretenden Lysinreste miteinander quervernetzt wurden. Bei allen handelte es sich um KP-Domänen (Domänen 4, 8, 10 und 12).

Hierbei waren die Lysine der Domänen 4, 8, 10 und 12 durch LNL quervernetzt und die Lysine der Domäne 8 (KPGK-Motiv) sowohl durch LNL als auch durch AA. Bei Domäne 10 handelt es sich überdies um zwei Lysine, die nur durch ein Prolin getrennt sind (KPK-Motiv). Dies stellt innerhalb der intrapeptidal quervernetzten Peptide einen Sonderfall dar, da es sich um die einzige Domäne handelt, in der die beiden Lysine nicht durch zwei oder drei Aminosäuren getrennt sind. Es wurden drei Peptide zugehörig zu dieser Quervernetzung identifiziert. Ein annotiertes Fragmentspektrum ( $^{174}\text{GVKPKAPGVGGA}$ ;  $m/z$  510,7955;  $z = 2$ ) ist beispielhaft in Abb. 31 A dargestellt. Darüber hinaus ist beispielhaft für eine durch LNL intrapeptidal quervernetzte KxxK-Domäne das Fragmentspektrum zu dem Peptid  $^{54}\text{GALGPGGKPLKPVP}$  ( $m/z$  664,3908;  $z = 2$ ) in Abb. 31 B zu finden. Neben diesen intrapeptidal quervernetzten Peptiden (vgl. Tab. A. 7) wurden 19 weitere Peptide identifiziert, die interpeptidal quervernetzt waren. Die identifizierten Peptide sind in Tab. A. 8 dargestellt. Es wurden 15 Peptide identifiziert, die durch LNL quervernetzt waren, und vier, die AA als vernetzende Aminosäuren trugen. Zu diesen gehörten drei KP-Domänen (4, 8 und 13) und zwei KA-Domänen (6 und 14). Interpeptidale Quervernetzungen fanden sowohl zwischen KP- und KA-Domänen statt sowie auch zwischen den beiden KA-Domänen 14 und 15, wobei LNL und AA in beiden Fällen als Quervernetzer zu finden waren. Es wurden zwölf Peptide identifiziert, die Domäne 13 mit diversen anderen Domänen verknüpften. Neben kurzen vernetzten Peptiden, die wenige Alaninreste trugen, konnten als eindeutig mit Domäne 13 vernetzt die Domänen 6 und 14 identifiziert werden. Auch die Domänen 14 und 15 waren durch LNL oder AA miteinander verbunden. Oftmals jedoch war eine eindeutige Zuordnung der zweiten Domäne wie bei Elastin aus *BTA* nicht möglich, da das andere Peptid lediglich ein oder zwei

Alaninreste trug, wodurch aufgrund der repetitiven Aminosäuresequenz von Elastin eine eindeutige Zuordnung nicht möglich war.



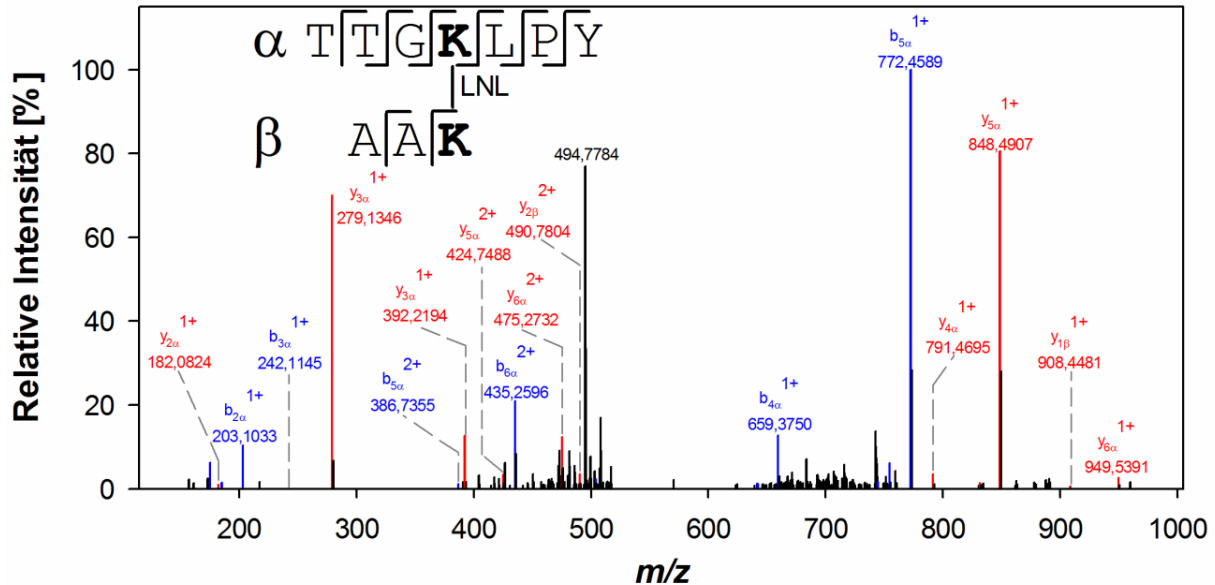
**Abb. 31: CID-Spektren der zwei durch LNL intrapeptidal quervernetzten Peptide GVKPKAPGVGGA und GALGPGGKPLKPVPG aus humanem Aortenelastin**

Die zugehörigen Peptidsequenzen sind in den jeweiligen Abbildungen angegeben. Quervernetzte Aminosäuren sind fett markiert. b-Ionen und y-Ionen sind blau bzw. rot dargestellt. Gleiches gilt für damit verwandte Ionen (interne Fragmente,  $H_2O$ -,  $NH_3$ -Verluste). [A] repräsentiert das Fragmentationsspektrum zu dem Vorläuferion  $m/z$  510,7955;  $z = 2$ . [B] repräsentiert das Fragmentationsspektrum zu dem Vorläuferion  $m/z$  664,3908;  $z = 2$ .

Das Fragmentspektrum eines dieser Peptide mit der Sequenz <sup>222</sup>TTGKLPY\_AAK ist in Abb. 32 dargestellt. Als eindeutig miteinander quervernetzt wurden folgende Domänen identi-



fiziert: KP-Domäne 13 mit KA-Domäne 14, KP-Domäne 13 mit KA-Domäne 6 sowie KA-Domäne 14 mit KA-Domäne 15. Da sich häufig Alaninreste an LNL oder AA fanden, ist es möglich, dass diese nicht zuzuordnenden Peptide auch anderen KA-Domänen entsprechen.



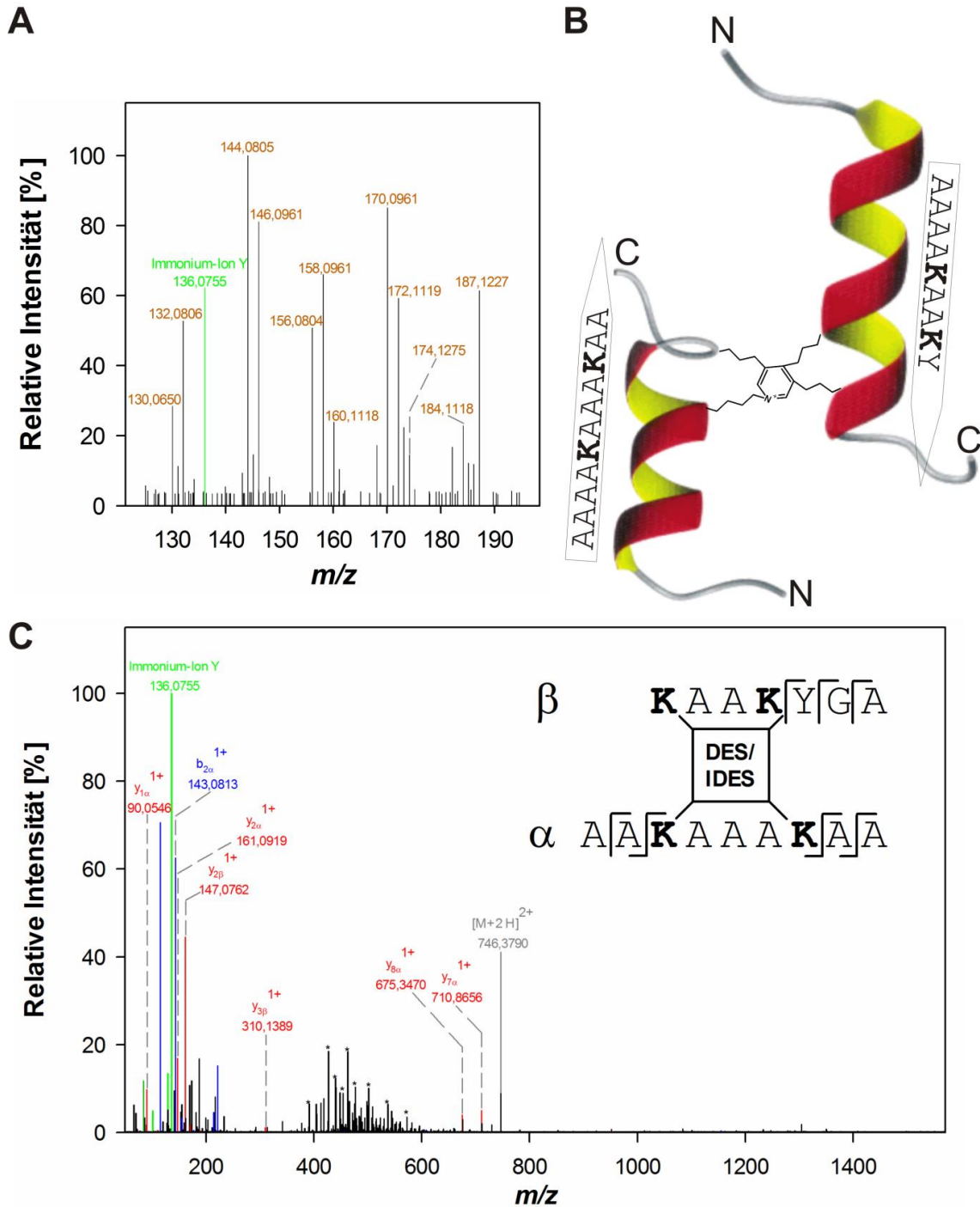
**Abb. 32: CID-Spektrum des durch LNL bifunktional interpeptidal quervernetzten Peptides TTKLPY\_AAK aus humanem Aortenelastin**

Quervernetzte Aminosäuren sind fett markiert. b-Ionen und y-Ionen sind blau bzw. rot dargestellt. Gleiches gilt für damit verwandte Ionen (interne Fragmente, H<sub>2</sub>O-, NH<sub>3</sub>-Verluste). Das entsprechende Vorläuferion wurde bei  $m/z$  525,7955;  $z = 2$  detektiert. Das doppelt geladene Fragmentation bei  $m/z$  494,7784 ist vermutlich durch den Neutralverlust von CO<sub>2</sub> entstanden.

#### 4.4.3 Tetrafunktional quervernetzte Peptide

Durch Fraktionierung des proteolytischen Elastinverdaus mittels RP-LC wie in Kap. 3.2.6 beschrieben, wurde ein Teil der tetrafunktional quervernetzten Peptide angereichert (vgl. Kap. 4.2.2) und anschließend wiederum massenspektrometrisch untersucht. Vorläuferionen wurden zur Identifizierung von DES/IDES sowohl bei 95 % NE im HCD-Modus fragmentiert als auch bei 35 % NE zur Sequenzierung. In humaner Aorta wurde ein Peptid ( $m/z$  746,3790;  $z = 2$ ) gefunden, das DES/IDES enthielt und das darüber hinaus auch eindeutig sequenziert werden konnte. Die Fragmentspektren bei 95 % NE und 35 % NE sind in Abb. 33 A und Abb. 33 C abgebildet. Wie eindeutig zu erkennen ist, wurden bei erhöhter Kollisionsenergie zunächst die gleichen Fragmentationen wie bei anderen DES/IDES-Verbindungen (vgl. Kap. 4.2.2) freigesetzt. Das Peptid erhielt deswegen einen DESGET-Score von 1. Darüber hinaus wurde auch

das abundante Immonium-Ion von Tyrosin bei  $m/z$  136,0755 bei dieser hohen Energie beobachtet.



**Abb. 33: HCD-Spektren und Strukturformel des tetrafunktional quervernetzten KAAKYGA\_AAKAAA Peptides aus humanem Aortenelastin**

Quervernetzte Aminosäuren sind fett markiert. b-Ionen und y-Ionen sind blau bzw. rot dargestellt. Gleiches gilt für damit verwandte Ionen (interne Fragmente,  $H_2O$ -,  $NH_3$ -Verluste). Immonium-Ionen und damit verwandte Ionen sind grün dargestellt. Ionen, die eine Kombination von b- und y-Spaltungen sind, sind mit einem Sternchen markiert. Für DES/IDES spezifische Fragmentationen sind dunkelorange beschriftet. [A] HCD-Spektrum von  $m/z$  746,3790 bei 95 % NE. [B] Eine mögliche Struktur des Peptides innerhalb von Elastin basierend auf NMR-Daten der KA-Domänen von Tamburro *et al.* (247). [C] HCD-Spektrum von  $m/z$  746,3790 bei 35 % NE mit zugehöriger Sequenz des DES/IDES-Peptides.

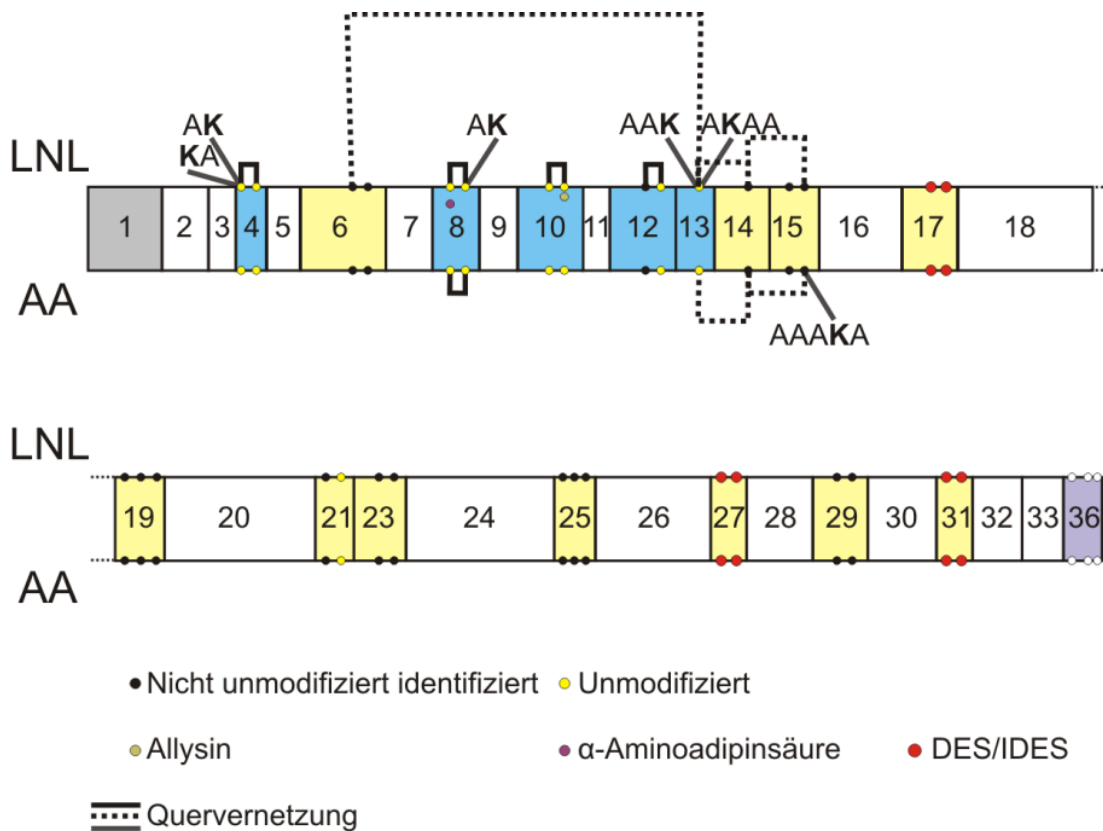
Die manuelle Sequenzierung basierend auf den Informationen, dass DES/IDES und Tyrosin enthalten sein mussten, ergab, dass es sich um ein Peptid handelte, das aus zwei miteinander verbundenen Peptidsträngen bestand. Die vollständige Sequenz lautet KAAKYGA\_AAKAAAKAA. Es handelt sich somit um zwei miteinander verknüpfte KA-Domänen.

Eine genaue Zuordnung ist aufgrund repetitiver Aminosäuresequenzen in der Aminosäuresequenz von TE nicht möglich. Die Sequenz KAAKYGA lässt sich den Domänen 17, 19, 21, 27 und 31 zuordnen. Die Sequenz AAKAAKAA kommt in den Domänen 19 und 23 vor. Basierend auf NMR-Daten linearer KA-Domänen (247) konnte eine mögliche strukturelle Anordnung des identifizierten quervernetzten Peptids erstellt werden (vgl. Abb. 33 B). NMR-spektroskopische Messungen hatten gezeigt, dass alle KA-Domänen innerhalb von TE eine  $\alpha$ -helikale Konformation einnehmen. Da die Lysinseitenketten durch zwei bzw. drei Alaninreste getrennt werden, sind diese auf der gleichen Seite der Helix platziert. Somit ergab sich als mögliche Struktur die Konformation von zwei quervernetzten  $\alpha$ -helikalen Peptidsträngen.

#### 4.4.4 Übersicht

Die massenspektrometrische Analyse von humanem Aortenelastin ergab, dass insbesondere Lysinreste aus KP-Domänen häufig als Teil linearer Peptide vorlagen und darüber hinaus auch sehr vielfältig modifiziert waren. So fand sich unter anderem, dass der Lysinrest K225 aus der KP-Domäne 13 teilweise nicht vernetzt, jedoch zu Allysin modifiziert vorlag und zudem auch mit Lysinresten aus KA-Domänen interpeptidal durch LNL verbunden war. Die zugehörigen KA-Domänen konnten aufgrund der ähnlichen Sequenz nicht immer eindeutig identifiziert werden. Eindeutig identifiziert werden konnte die Verknüpfung mit der KA-Domäne 6 sowie mit der benachbart liegenden Domäne KA-Domäne 14. Die kovalente Verknüpfung zu der KA-Domäne 14 erfolgte über LNL und AA. Lysine aus KA-Domänen wurden vergleichsweise wenig detektiert. Dabei wurden auch kaum lineare Peptide gefunden. Sonderfälle waren hierbei K451 aus Domäne 21, das als nicht modifizierter Teil eines linearen Peptides gefunden wurde, und das in Kap. 4.3.3 charakterisierte tetrafunktional quervernetztes Peptid, das zwei KA-Domänen verband. Eine genaue Übersicht über die identifizierten Lysine und deren Modifikationen in humanem Aortenelastin ist in Abb. 34 gezeigt. Hydro-

xyprolin fand sich ausschließlich innerhalb des xPG-Motivs wieder. Peptide, die dem C-Terminus angehören, wurden wie bei Aortenelastin aus *BTA* nicht beobachtet.



**Abb. 34: Identifizierte quervernetzten und nicht quervernetzten Lysinreste in humanem Elastin**

Domänen sind entsprechend des zugehörigen Exons nummeriert. Das Signalpeptid ist grau dargestellt. Hydrophobe Domänen sind weiß, Quervernetzungsdomänen sind blau (KP-Domänen) und gelb (KA-Domänen) markiert. Lysinreste, die potenziell kovalent quervernetzt werden können, jedoch nicht identifiziert wurden, sind als schwarz ausgefüllte Kreise dargestellt. Lysinreste, die als Teil linearer Peptide identifiziert wurden, sind gelb markiert. Abhängig davon ob identifizierte quervernetzte Peptide durch LNL oder AA vernetzt waren, befindet sich die Annotation ober- oder unterhalb der Domänenstruktur. Intrapeptidal quervernetzte identifizierte Aminosäuren sind durch einen schwarzen Balken miteinander verbunden. Interpeptidal quervernetzte Aminosäuren sind durch einen schwarzen gestrichelten Balken miteinander verbunden. Quervernetzte Peptide, die sich nicht eindeutig einer Domäne zuordnen ließen, sind im Einbuchstabencode dargestellt. Allysine sind dunkelgelb und  $\alpha$ -Aminoadipinsäure lila gezeigt. Lysine, die von der sie umgebenden Aminosäuresequenz zu den identifizierten DES/IDES-Peptiden passen könnten, sind als rote Kreise dargestellt. Die C-terminal liegende Domäne 36 ist violett gefärbt. Darin enthaltene Lysinreste sind als weiße Kreise markiert.

## 4.5 Molekulare Charakterisierung von Elastin isoliert aus *Xenopus tropicalis*

Die TE-Sequenz von Amphibien unterscheidet sich grundlegend von der Sequenz der Säugetiere. Obwohl auch dort die TE-Sequenz in hydrophobe Domänen und Quervernetzungsdomänen gegliedert ist, ist die Aminosäurezusammensetzung deutlich verändert (vgl. Tab. A. 1). So ist der Gehalt an Glycin und Prolin beim tropischen Krallenfrosch (*Xenopus tropicalis*, *XTR*) mit je 38,7 % (TE-*BSA*: 31,9 %, TE-*HTA*: 29,1 %) und 15,5 % (TE-*BSA*: 11,9 %, TE-*HTA*: 12,6 %) erhöht, wohingegen der Gehalt von Valin und Alanin niedriger ist. Das liegt daran, dass der überwiegende Anteil der Quervernetzungsdomänen im Vergleich zu Elastin von Säugetieren nicht aus KA-Domänen, sondern aus KP-Domänen besteht. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, inwiefern sich dies in einem veränderten Quervernetzungsmuster niederschlägt. Als Modellorganismus für Amphibien wurde in der vorliegenden Arbeit *XTR* gewählt, weil dessen Genom vollständig sequenziert ist. Elastin aus der Lunge von *XTR* wurde entsprechend Kap. 3.2.2 isoliert.

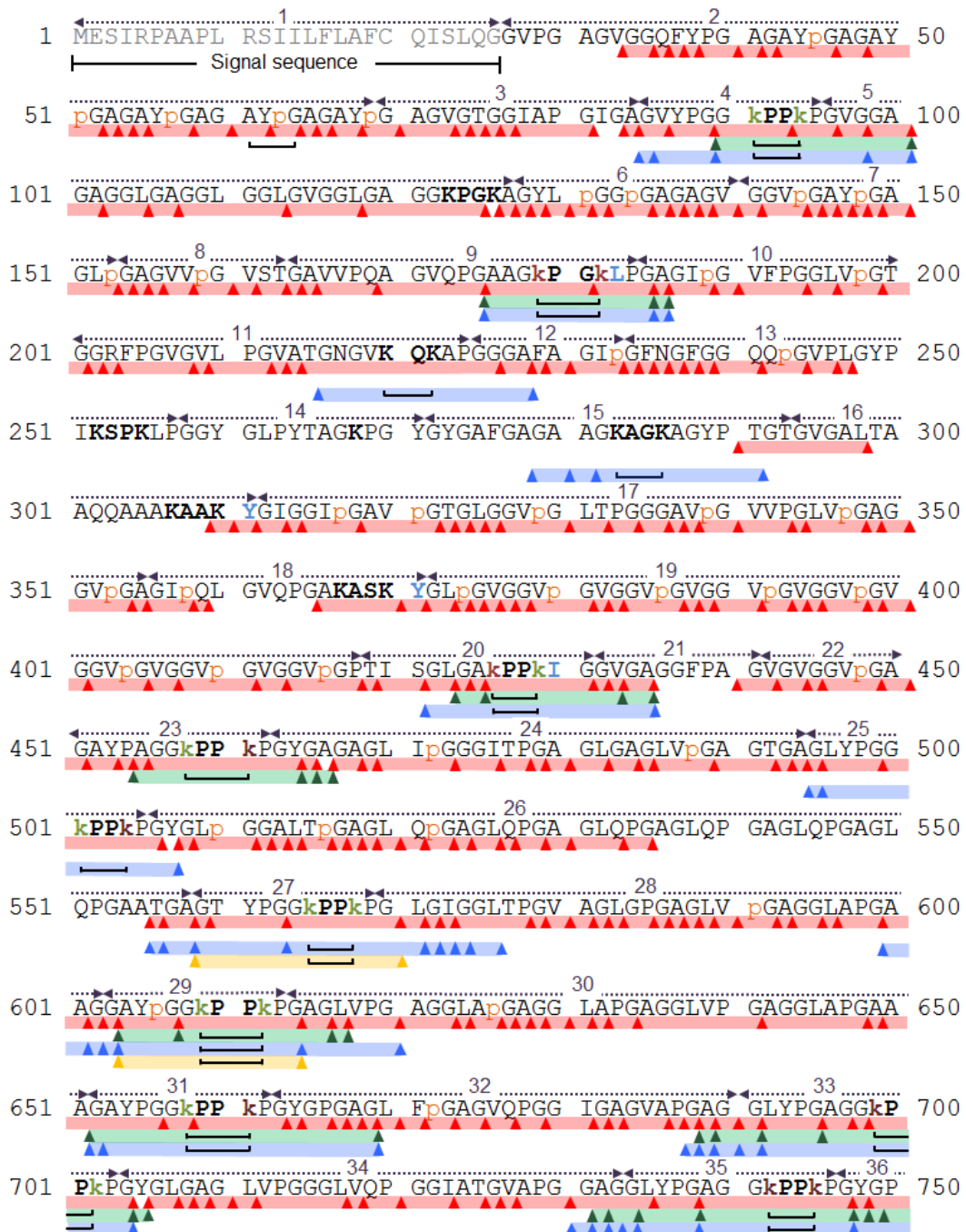
Bei *XTR* sind im Vergleich zu TE aus Säugetieren zwei Elastingene bekannt, die in verschiedenen Gewebetypen des Körpers unterschiedlich stark exprimiert werden (66,231). TE1 besitzt lediglich drei KA-Domänen, die durch die Exons 15, 16 und 18 kodiert werden, jedoch 21 KP-Domänen, eine Domäne mit einem einzelnen Lysin (Domäne 14) und eine Domäne, in der die beiden Lysine durch einen einzelnen Glutaminrest getrennt sind (Domäne 11). Diese wird aufgrund der Sequenzhomologie zu den KPK-Domänen bei *HSA* und *BTA* zu den KP-Domänen gezählt (vgl. Abb. A. 1). Insgesamt besitzen 17 der 21 KP-Domänen das KPPK-Motiv, das auch beim Elastin aus *BTA* in Domäne 35 zu finden ist. TE1 besteht aus 55 Exons und ist 1183 Aminosäuren lang inklusive des aus 26 Aminosäuren bestehenden Signalpeptides. Die C-terminale Domäne 55 besitzt ähnlich dem Elastin von Säugetieren ein Sequenzmotiv mit basischem Charakter (RRRK-Motiv bei *XTR* anstatt des RKRK-Motivs bei Säugetieren) und zwei Cysteine, die *in vivo* disulfidverbrückt vorliegen. TE2 aus *XTR* gliedert sich in 40 Exons und ist 579 Aminosäuren lang unter Berücksichtigung des Signalpeptides. Auch dort wechseln sich Quervernetzungsdomänen mit hydrophoben Domänen ab. Insgesamt gibt es 16 potentielle Quervernetzungsdomänen mit einem oder paarweise angeordneten Lysinen. Der C-Terminus ist verkürzt und enthält im Gegensatz zu TE1 von *XTR* oder Säugetieren kein basisches Motiv oder ähnliches und darüber hinaus nur ein Cystein (231). Die massenspektrometrische Analyse von proteolytisch hydrolysiertem Elastin aus *XTR* erfolgte nanoHPLC-

gekoppelt an dem nanoESI-Orbitrap Fusion Tribrid MS (vgl. Kap. 3.3.6) sowie ggf. nach vorheriger Fraktionierung wie in Kap. 3.2.6 beschrieben.

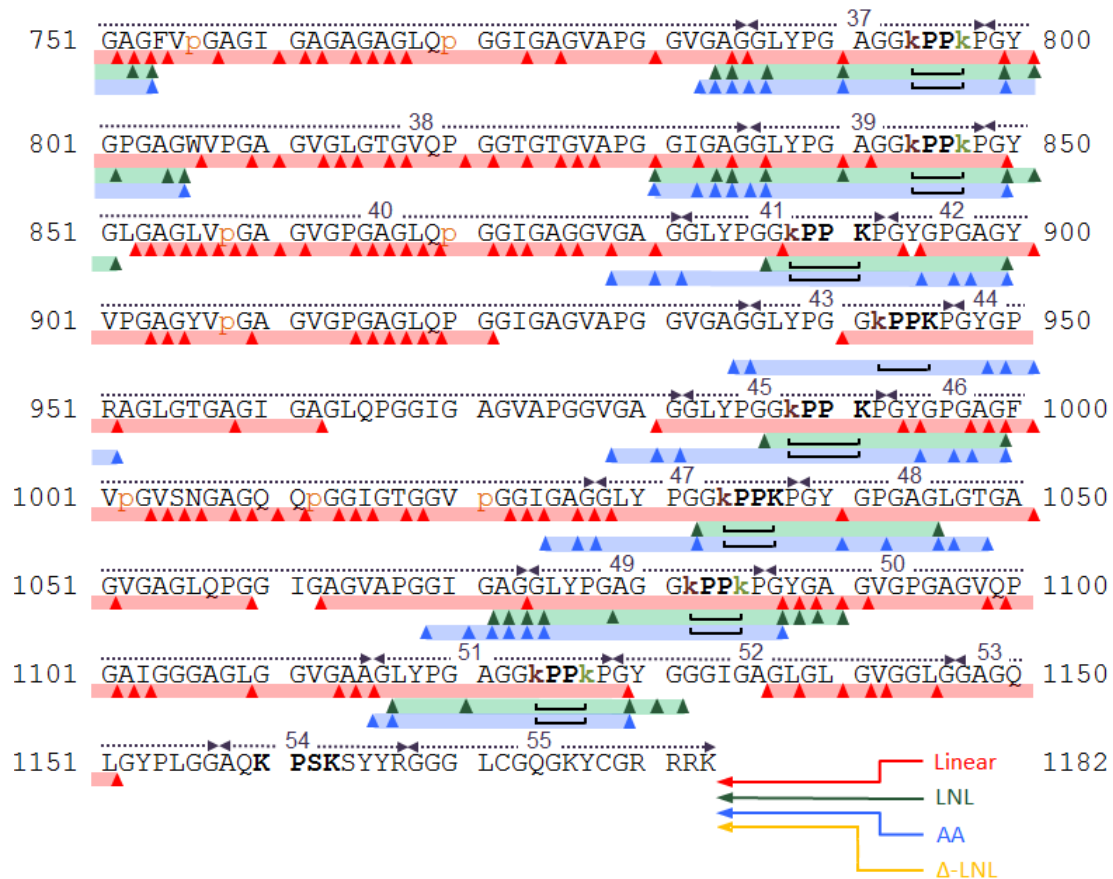
### 4.5.1 Lineare Peptide

Die Sequenzierung durch die PEAKS-Software lieferte eine Anzahl von 630 linearen Peptiden, die TE1 zugeordnet wurden. Es wurde kein Peptid identifiziert, das einzig in der Sequenz von TE2 vorhanden war. Da sich die beiden Proteine sequentiell stark unterscheiden, waren alle identifizierten Peptide einzigartig für TE1. Aus diesem Grund fokussiert sich in dieser Arbeit die Analyse von Quervernetzungen im Elastin von *XTR* auf TE1. Identifizierte Peptide waren zwischen 5 und 48 Aminosäuren lang. Eine exakte Sequenzabdeckung anzugeben ist nicht möglich, da die Aminosäuresequenz beim Froschelastin noch repetitiver ist als bei Säugetieren und deshalb viele identifizierte Peptide nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. So ist allein die KP-Domäne GLYPGAGGKPPKP sechsmal in der Sequenz vorhanden (Domänen 33, 35, 37, 39, 49 und 51) und die KP-Domäne mit der Sequenz GLYPGGKPPKP viermal (Domänen 25, 41, 43 und 45). Diese Repetitivität tritt bevorzugt am C-terminalen Teil auf. Eine genaue Analyse der Domänenanordnung von TE1 bei *XTR* ist an anderer Stelle im Detail beschrieben (66). Deshalb wurden identifizierte Peptide, die mehrfach in der Sequenz auftauchen, an jeder dieser Stellen auch berücksichtigt und in die Analyse der Sequenzabdeckung mit einbezogen. So ergab sich unter dieser Prämisse eine Sequenzabdeckung von 85 %. Auch im Elastin vom tropischen Krallenfrosch wurde der C-Terminus samt der Disulfidbrücke nicht detektiert. Eine Übersicht identifizierter linearer Peptide mitsamt proteolytischer Spaltstellen ist in Abb. 35 gegeben. Es wurden keine Aminosäureaustausche mithilfe des SPIDER-Algorithmus ermittelt. 48 Prolinreste wurden identifiziert, die partiell hydroxyliert vorlagen. Diese lagen ausschließlich in dem xPG-Motiv vor, wobei x Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Glutamin, Threonin, Phenylalanin oder Tyrosin war. Von den insgesamt 179 vorhandenen Prolinresten wurden 18 nicht als Teil linearer Peptide wiedergefunden und 113 nicht hydroxyliert. Bei der Analyse der linearen Peptide fiel auf, dass innerhalb der KP-Domänen oft Peptide identifiziert wurden, bei denen ein Prolin hydroxyliert vorlag und das direkt benachbarte Lysin zu Allysin modifiziert worden war. Obwohl die ermittelten Peptide einen hohen PEAKS-Score aufwiesen, erschien dieses Ergebnis nicht realistisch, weil einerseits Prolinreste mit einem C-terminal liegenden Lysin nicht dem xPG-Motiv entsprechen und andererseits diese Modifikationen nicht nur zusammen auftreten sollten. Ein Hydroxyprolin ohne ein gleichzeitig auftretendes Allysin an dieser Stelle wurde nicht ermit-

telt. Ein Blick in die Fragmentspektren zeigte, dass es sich zwar um fast vollständig annotierte Spektren handelte, die Ionenserie jedoch nie vollständig war. Die b- und y-Ionen zwischen Prolin und Lysin fehlten oder waren extrem niedrig abundant. In Abb. A. 18 ist dafür als Beispiel das PEAKS-Ergebnis für ein zweifach geladenes Peptid mit dem  $m/z$ -Wert 490,2641 abgebildet. Für das Peptid wurde durch PEAKS die Sequenz  $^{90}\text{GKP-Hyp-Lya-PGVGGA}$  ermittelt.



## Ergebnisse



**Abb. 35: Spaltstellenanalyse von Lungenelastin aus XTR, verdaut mit der Protease PE**

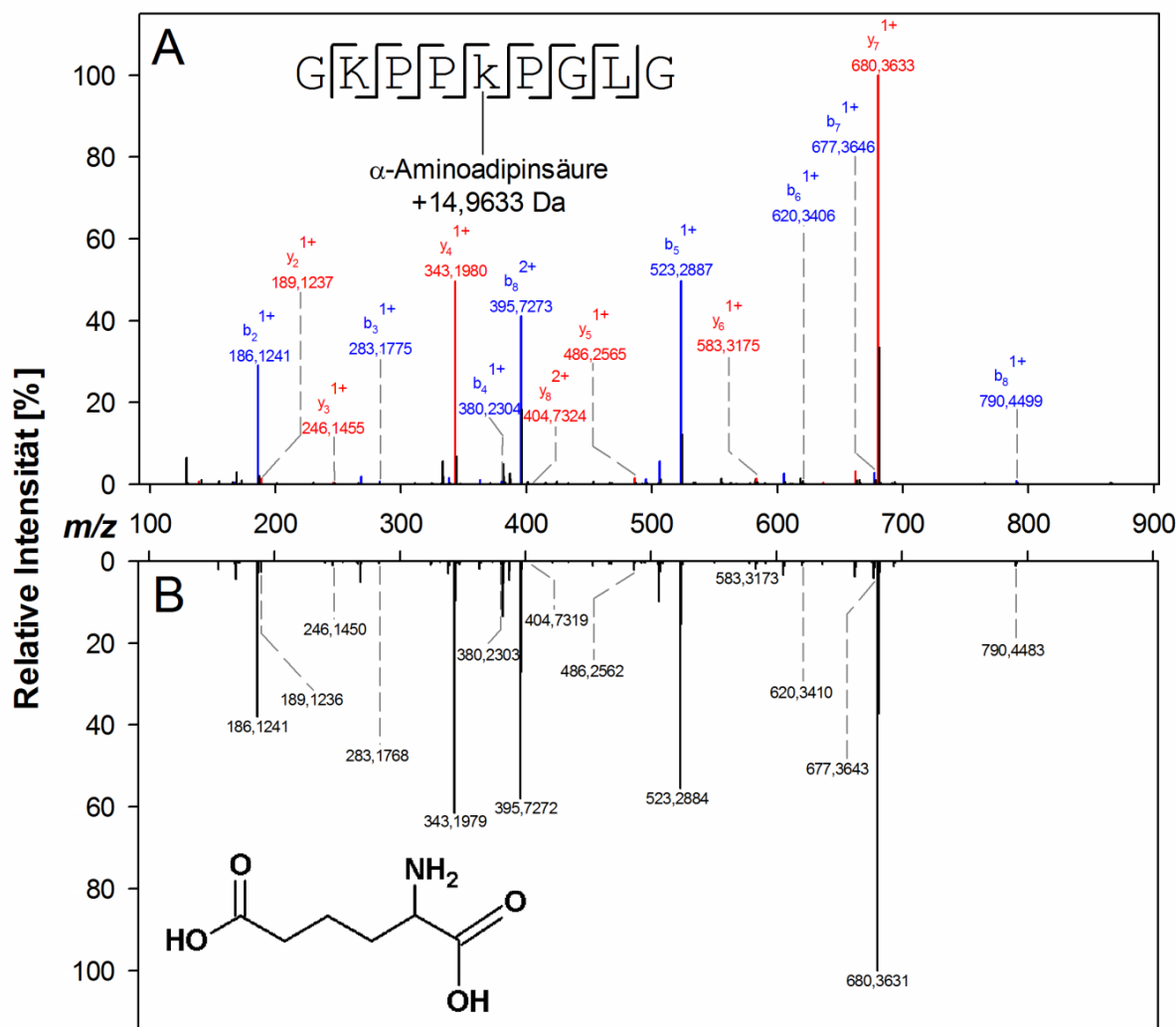
Die jeweilige Domäne ist gestrichelt über der Sequenz gezeigt. Spaltstellen sind durch aufrechte Dreiecke markiert (lineare Peptide: rot, durch LNL intrapeptidal quervernetzte Peptide grün, durch AA intrapeptidal quervernetzte Peptide blau und durch Δ-LNL intrapeptidal quervernetzte Peptide orange) und sequenzierte Regionen mit farblich entsprechenden Balken. Partiiell hydroxylierte Prolinreste sind als kleine orangefarbene Buchstaben gekennzeichnet. Intrapeptidal quervernetzte Aminosäuren sind durch einen schwarzen Balken miteinander verbunden. Lysine, die modifiziert zu α-Amino adipinsäure vorlagen, sind als kleine dunkelrote Buchstaben gekennzeichnet. Lagen sie darüber hinaus auch als Allysin vor, sind sie olivgrün dargestellt.

Da der starke Verdacht bestand, dass es sich in Wahrheit um eine andere Modifikation handelte, die von dem Algorithmus nicht berücksichtigt worden war, wurde ermittelt, welche PTMs von Prolin oder Lysin noch möglich sind und den gleichen Massenunterschied verursachen. Die einzige Modifikation, die infrage kommt, ist α-Amino adipinsäure (Aad). Diese PTM kann durch die Oxidation von Allysin entstehen (248) und verursacht einen Massenunterschied von + 14,9633 Da im Vergleich zu Lysin. Die Strukturformel ist in Abb. 36 B abgebildet. Die PTM wurde als variable Modifikation von Lysin in den Suchalgorithmus implementiert. Obwohl auch weiterhin die Hydroxylierung von Prolin sowie Lysin zu Allysin berücksichtigt wurde, wurde jedes Peptid, das zuvor als Kombination dieser beiden PTMs identifiziert wurde, fortan als Modifikation von Lysin zu α-Amino adipinsäure identifiziert. Das neu annotierte Fragmentspektrum des nun korrekt identifizierten Peptides <sup>90</sup>GKPP-Aad-



PGVGGGA ist in Abb. A. 19 abgebildet. Zur Bestätigung, dass es sich bei diesen identifizierten Peptiden tatsächlich um diese PTM handelte, wurde eine Peptidsynthese der ebenfalls identifizierten Peptide  $^{424}\text{GAKPP-Aad-IG}$  ( $m/z$  391,7239;  $z = 2$ ) sowie  $^{564}\text{GKPP-Aad-PGLG}$  ( $m/z$  433,2425;  $z = 2$ ) in Auftrag gegeben (vgl. Kap. 3.1.4) und die beiden Peptidstandards unter den gleichen Bedingungen (CID, 35 % NE) an dem Orbitrap Fusion Tribrid MS analysiert. Die Fragmentationenspektren der beiden Peptide sind vergleichend in Abb. A. 20 und Abb. 36 dargestellt. Wie eindeutig zu erkennen ist, stimmen die Fragmentationen sowohl qualitativ als auch bezogen auf die relativen Intensitäten fast vollständig miteinander überein. Nur das synthetisierte Peptid GAKPP-Aad-IG zeigt im Fragmentationenspektrum ein in dem anderen Spektrum nicht zu beobachtendes Ion bei  $m/z$  149,02332. Dieses konnte jedoch protoniertem Phtalsäureanhydrid zugeordnet werden und war dadurch entstanden, dass das im Zuge der Ionisierung durch Elektrospray oft beobachtete Hintergrundion Diisooctylphtalat bei  $m/z$  391,2842 durch das Isolationsfenster mit einer Breite von 2 Th ebenfalls isoliert und fragmentiert worden war (249). Das Vorläuferionenspektrum dazu ist in Abb. A. 20 B abgebildet. Somit konnte gezeigt werden, dass es sich tatsächlich um  $\alpha$ -Aminoadipinsäure als PTM handelt. Insgesamt wurden 30 Lysinreste (inkl. repetitiver Abschnitte), die partiell zu  $\alpha$ -Aminoadipinsäure modifiziert waren, identifiziert. Davon wurden 13 auch als Allysin gefunden. Es fanden sich keine Lysinreste, die ausschließlich Allysin als PTM trugen. Alle identifizierten Peptide, die Allysin oder  $\alpha$ -Aminoadipinsäure als PTM trugen, sind in Tab. A. 9 dargestellt.

Von den 51 potenziellen Lysinresten in TE1, die in Quervernetzungen eingebunden sein können (plus die beiden Lysine aus der C-terminalen Domäne 55), wurden lediglich neun Lysinreste nicht als Teil linearer Peptide identifiziert (vgl. Abb. 35). Diese waren den Domänen 5, 13, 14, 15, 16 und 54 zuzuordnen. Von den 42 identifizierten Lysinresten wurden zehn identifiziert, die ausschließlich unmodifiziert als Teil linearer Peptide vorlagen. Dabei handelte es sich um Lysine aus den Domänen 5, 11, 16, 18, 41, 43, 45 und 47. Bei den Domänen 41, 43, 45 und 47 muss berücksichtigt werden, dass die Aminosäuresequenzen dort repetitiv sind und sich deshalb nicht eindeutig zuordnen lässt, welcher dieser Domänen die Lysine exakt zuzuordnen sind.



**Abb. 36: CID-Spektren bei 35 % NE des Peptides GKPP-Aad-PGLG identifiziert in Elastin von XTR sowie des synthetisierten Peptides GKPP-Aad-PGLG**

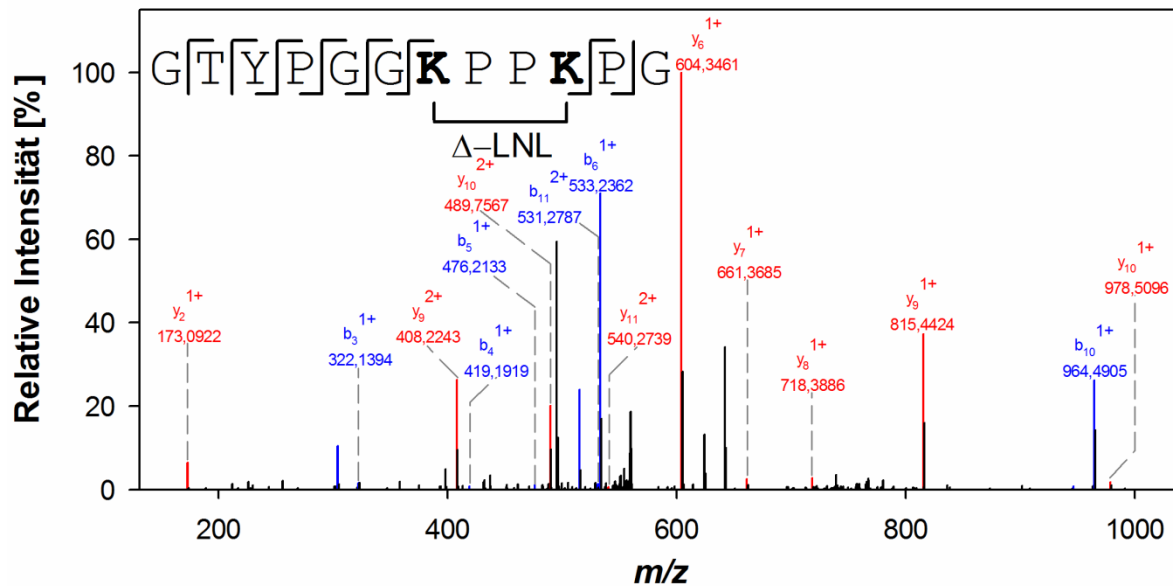
[A] Fragmentationenspektrum des Peptides GKPP-Aad-PGLG aus Elastin. b-Ionen und y-Ionen sind blau bzw. rot dargestellt. Gleiches gilt für damit verwandte Ionen (interne Fragmente,  $H_2O$ -,  $NH_3$ -Verluste). Das Vorläuferion war bei  $m/z$  433,2425;  $z = 2$ . [B] zeigt das Fragmentationenspektrum des synthetisierten Peptides GKPP-Aad-PGLG sowie die Strukturformel von  $\alpha$ -Amino adipinsäure. Der  $m/z$ -Wert des zweifach geladenen Vorläuferions betrug 433,2446.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind diese Lysinreste je nach Art der vorhandenen Modifikationen unterschiedlich farbig in Abb. 35 eingefärbt. Meist waren die modifizierten Lysine Bestandteile von KPPK-Motiven. Als Beispiel für die Vielfältigkeit der möglichen Modifikationen sei das schon beschriebene Peptid  $^{90}GKPPKPGVGGGA$  aus den Domänen 4 und 5 genannt. Bei diesem Peptid wurden beide Lysinreste sowohl unmodifiziert als auch jeweils zu Allysin bzw.  $\alpha$ -Amino adipinsäure modifiziert identifiziert. Dabei lag das jeweils andere Lysin meist unmodifiziert vor. Die annotierten CID-Spektren für die Peptide G-Lya/Aad-PPKPGVGGGA sind in Abb. A. 21 gegeben und für GKPP-Lya/Aad-PGVGGGA ent-

sprechend in Abb. A. 22. Weitere Beispiele für den Fall, dass beide Lysine einer Domäne sowohl zu Allysin als auch zu  $\alpha$ -Amino adipinsäure modifiziert waren, fanden sich in den Domänen 27 und 29.

#### 4.5.2 Bifunktional quervernetzte Peptide

Bifunktional quervernetzte Peptide in Lungenelastin aus *XTR* wurden, wie in Kap. 4.3.2 und Kap. 3.4.3 beschrieben, identifiziert. Aufgrund der großen Anzahl möglicher Kombinationen und falsch positiver Identifizierungen wurde auch beim tropischen Krallenfrosch jedes Fragmentspektrum manuell überprüft. Mittels modifizierter Datenbanken in PEAKS wurden 60 intrapeptidal quervernetzte Peptide identifiziert (vgl. Tab. A. 10). Diese konnten unter Berücksichtigung repetitiver Domänen 20 von 25 möglichen Quervernetzungsdomänen zugeordnet werden. Eine Übersicht intrapeptidal quervernetzter Peptide ist in Abb. 35 zu finden. Einzig die Domänen 5, 13, 14, 16, 18 und 54 wurden nicht als intrapeptidal quervernetzte Peptide identifiziert. Hierbei handelt es sich um drei KP-Domänen (Domänen 5, 13 und 54), ein einzelnes Lysin (Domäne 14) sowie zwei der drei KA-Domänen (Domänen 14 und 18). Alle anderen Domänen wurden entweder durch AA, LNL und sogar oft durch jeweils beide intrapeptidal mit sich selbst quervernetzt. Zusätzlich konnte ermittelt werden, dass die beiden Lysinreste in den KP-Domänen 27 und 29 auch über  $\Delta$ -LNL miteinander verbunden waren. Diese Quervernetzung wurde in humanem und bovinem Elastin nicht identifiziert. Beispielhaft für ein solches Peptid ist das CID-Spektrum des zweifach geladenen Vorläuferions mit dem  $m/z$ -Wert 568,7907 in Abb. 37 gezeigt. Dabei handelt es sich um das intrapeptidal quervernetzte Peptid  $^{559}\text{GTYPGGKPPKPG}$  aus Domäne 27. Darüber hinaus war Domäne 27 auch über AA mit sich selbst verbunden. Domäne 29 zeigte auch intrapeptidale Verknüpfungen über AA und LNL.

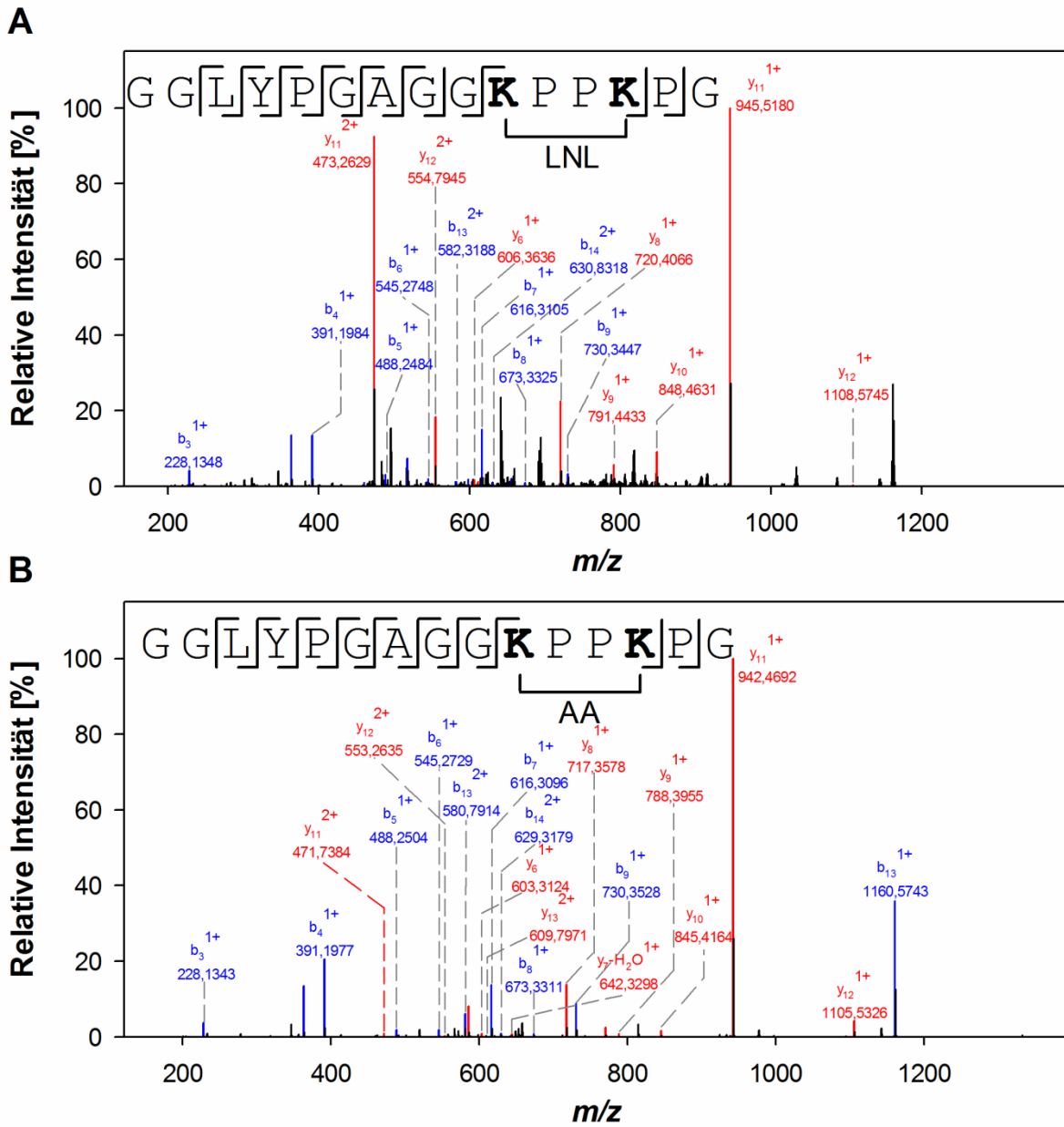


**Abb. 37: CID-Spektrum des durch  $\Delta$ -LNL bifunktional intrapeptidal quervernetzten Peptides GTYPGGKPPKPG aus Lungenelastin von XTR**

Quervernetzte Aminosäuren sind fett markiert. b-Ionen und y-Ionen sind blau bzw. rot dargestellt. Gleiches gilt für damit verwandte Ionen (interne Fragmente, H<sub>2</sub>O-, NH<sub>3</sub>-Verluste). Das entsprechende Vorläuferion war bei  $m/z$  568,7907;  $z = 2$ .

Beispielhaft für eine Domäne, in der die Lysine sowohl über LNL als auch AA intrapeptidal verbunden sind, sind die annotierten Fragmentspektren für die doppelt geladenen Vorläuferionen der Sequenz GGLYPGAGGKPPKPG in Abb. 38 dargestellt. Es handelt sich bei der intrapeptidal vernetzten Domäne potenziell um die KP-Domänen 33, 35, 37, 39 und 49. Insgesamt waren die Lysinreste von 15 Domänen intrapeptidal durch AA quervernetzt. Zu diesen zählten auch die Domänen 11 und 15, die ausschließlich durch AA intrapeptidal quervernetzt waren. Domäne 11 enthält als Besonderheit das KQK-Motiv, das analog zu dem KPK-Motiv aus dem Elastin von Säugetieren ist. Der Glutaminrest war zu Glutamat deamidiert worden. Domäne 15 enthält ein KAGK-Motiv. Das CID-Spektrum für das zweifach geladene Vorläuferion mit dem  $m/z$ -Wert 465,2218 des Peptides <sup>282</sup>GKAGKAGYPT ist in Abb. A. 23 dargestellt. Darüber hinaus ist das CID-Spektrum des intrapeptidal quervernetzten Peptides <sup>216</sup>GNGVKEKAPGGGA ( $m/z$  561,2652) in Abb. A. 24 gezeigt. Neben dieser großen Anzahl von intrapeptidal quervernetzten Peptiden wurde lediglich ein interpeptidal quervernetztes Peptid zuverlässig identifiziert. Hierbei handelt es sich um das Peptid GGKPPKPG<sub>305</sub>AAKAA, das als dreifach geladenes Vorläuferion mit dem  $m/z$ -Wert 383,2081 selektiert worden war. Die Quervernetzung erfolgte durch AA. Das zugehörige Fragmentationsspektrum ist in Abb. A. 25 dargestellt. Die Aminosäuresequenz GGKPPKPG lässt sich theo-

retisch 16 verschiedenen Domänen in der Aminosäuresequenz von TE1 zuordnen. Das Motiv AAKAA ist hingegen nur in der KA-Domäne 16 von TE1 zu finden.



**Abb. 38: CID-Spektren der intrapeptidal quervernetzten Peptide GGLYPGAGGKPPKPG (LNL) und GGLYPGAGGKPPKPG (AA) aus Lungenelastin von *XTR***

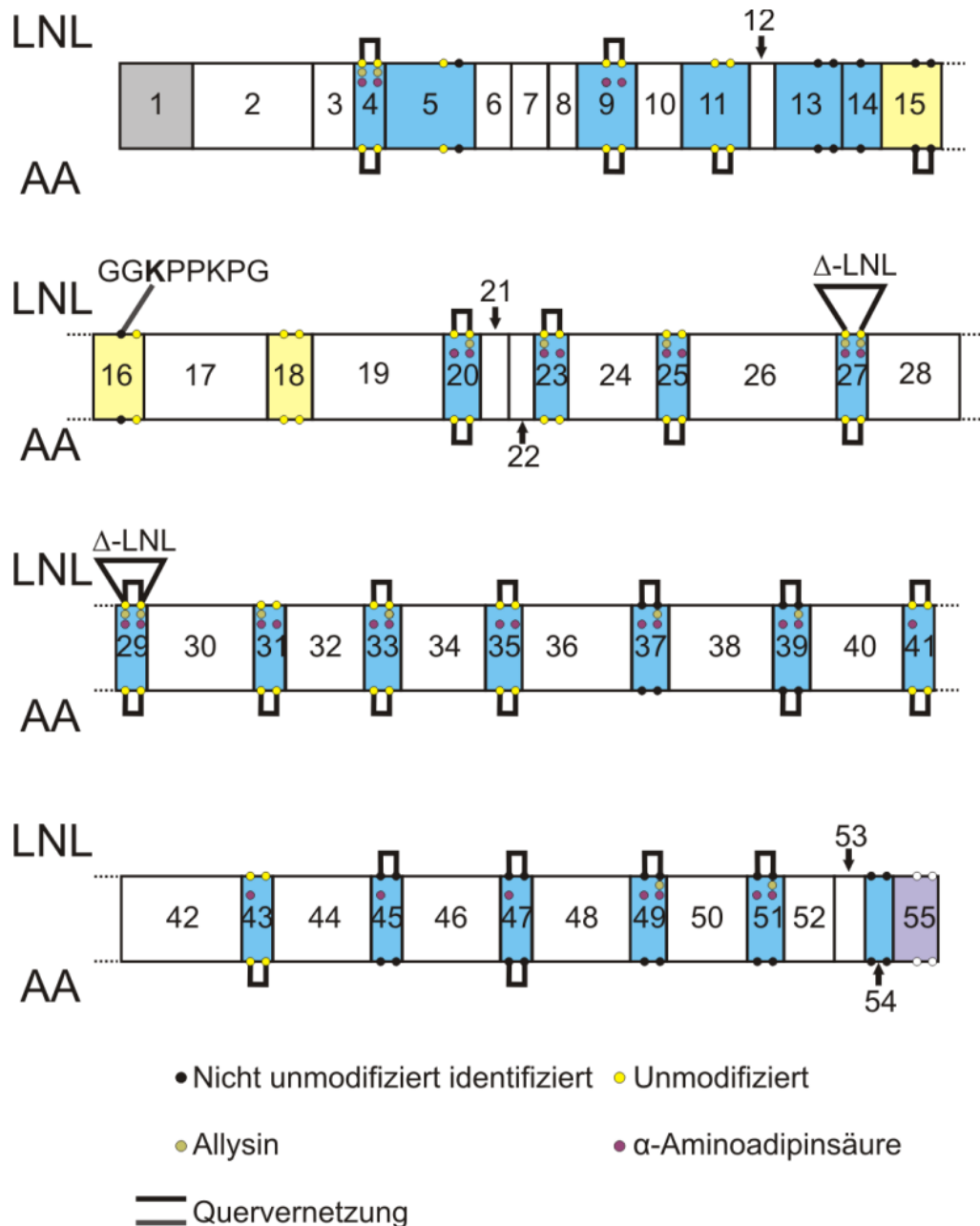
b-Ionen und y-Ionen sind blau bzw. rot dargestellt. Gleiches gilt für damit verwandte Ionen (interne Fragmente,  $H_2O$ -,  $NH_3$ -Verluste). Die entsprechende Vorläuferionen waren bei [A]  $m/z$  668,3567;  $z = 2$  und [B]  $m/z$  666,8337;  $z = 2$ .

### 4.5.3 Übersicht

Obwohl zwei Elastingene beim tropischen Krallenfrosch bekannt sind, wurde lediglich das Protein kodiert von TE1 in isoliertem Lungenelastin identifiziert. Die massenspektromet-

rische Analyse von Elastin isoliert aus *XTR* ergab weiter, dass, wie bei humanem und bovinem Elastin auch beobachtet, kein homogenes Muster erkennbar war bezüglich der Quervernetzungsdomänen und deren Involvierung in Quervernetzungen. Die C-terminal liegende Domäne 55 wurde nicht identifiziert. Ähnlich dem Elastin aus Säugetieren wurde auch Hydroxyprolin auf molekularer Ebene innerhalb des xPG-Motivs identifiziert. Im Gegensatz zu dem Elastin aus Säugetieren wurde jedoch eine außergewöhnlich hohe Anzahl von intrapeptidal quervernetzten Domänen gefunden und auch  $\Delta$ -LNL als Quervernetzungsaminosäure identifiziert. Lediglich vier Quervernetzungsdomänen wurden nicht intrapeptidal quervernetzt gefunden.

Darüber hinaus wurde eine hohe Anzahl von Peptiden identifiziert, die Lysin entweder unmodifiziert enthielten, oder zu Allysin und  $\alpha$ -Aminoadipinsäure oxidiert. Das Vorhandensein von  $\alpha$ -Aminoadipinsäure konnte durch synthetisch hergestellte Peptide zweifelsfrei belegt werden. Eine Übersicht aller identifizierten Lysinreste und deren PTMs, ist in Abb. 39 angezeigt. Die Vielfältigkeit der möglichen Quervernetzungen lässt sich bei Elastin aus *XTR* gut an den Lysinen der Domänen 4, 20, 27 oder 29 beschreiben. So fand sich, dass diese intrapeptidal vernetzt, unmodifiziert oder zu Allysin und  $\alpha$ -Aminoadipinsäure umgewandelt vorlagen. Diese Variabilität wurde meist für KP-Domänen beobachtet. Peptide, die KA-Domänen abdeckten, waren seltener vorhanden. Jedoch wurde auch die KA-Domäne 15 als durch AA intrapeptidal vernetzt gefunden und die Lysine der KA-Domänen 16 und 18 als nicht modifizierte Aminosäuren identifiziert. Tetrafunktional quervernetzte Peptide wurden in Elastin aus dem tropischen Krallenfrosch trotz Anreicherung durch Fraktionierung sowie in Kombination mit dem DESGET-Algorithmus nicht identifiziert. Dennoch wiesen LC-MS-Experimente darauf hin, dass DES/IDES als quervernetzende Aminosäuren vorhanden sind (vgl. Kap. 4.2.3). Die Existenz von DES/IDES wurde zusätzlich durch eine MALDI-TOF/TOF MS Analyse von totalhydrolysiertem Lungenelastin aus *XTR* mit nachfolgender Propionylierung (vgl. Kap. 3.2.1 und Kap. 3.2.3) zweifelsfrei belegt. Bei dem erwarteten  $m/z$ -Wert von 750,40 wurde ein abundantes Ion beobachtet, das im Zuge von CID das gleiche Fragmentationsspektrum wie ein propionylierter DES-Standard zeigte (vgl. Abb. A. 26).



**Abb. 39: Identifizierte quervernetzte und nicht quervernetzte Lysinreste in Elastin aus XTR**

Domänen sind entsprechend des zugehörigen Exons nummeriert. Das Signalpeptid ist grau dargestellt. Hydrophobe Domänen sind weiß, Quervernetzungsdomänen sind blau (KP-Domänen und sonstige) und gelb (KA-Domänen) markiert. Lysinreste, die potenziell kovalent quervernetzt werden können, jedoch nicht unmodifiziert gefunden wurden, sind als schwarz ausgefüllte Kreise dargestellt. Lysinreste, die als Teil linearer Peptide unmodifiziert identifiziert wurden, sind gelb markiert. Lysine, die als freies Allysin gefunden wurden, sind dunkelgelb dargestellt. Handelte es sich um  $\alpha$ -Amino adipinsäure, so ist dieser Rest violett gezeigt. Abhängig davon, ob identifizierte quervernetzte Peptide durch LNL oder AA vernetzt waren, befindet sich die Annotation ober- oder unterhalb der Domänenstruktur.  $\Delta$ -LNL quervernetzte Peptide sind separat gezeigt. Intrapeptidally quervernetzte identifizierte Aminosäuren sind durch einen schwarzen Balken miteinander verbunden. Die C-terminal liegende Domäne 55 ist violett gefärbt. Darin enthaltene Lysinreste sind als weiße Kreise markiert.

## 5 Diskussion

### 5.1 Proteolytische Aktivität von Proteasen gegenüber Tropoelastin und Elastin

#### 5.1.1 Abbau von Tropoelastin durch Pankreaselastase

Das Strukturprotein Elastin ist mittels spezifisch spaltender Proteasen nicht abbaubar. Aufgrund dessen stellte sich zu Beginn der vorliegenden Arbeit die Frage, welche Protease mit elastolytischen Eigenschaften gewählt werden sollte, um Elastin vor der massenspektrometrischen „*bottom-up*“-Analyse zu hydrolysieren (96). Zur besseren Reproduzierbarkeit sollte für alle Untersuchungen an nativem Elastin die gleiche Protease verwendet werden. PE ist eine hochaktive Elastase, deren Spaltspezifität bereits in anderen Studien untersucht wurde. So wurde diese von Rietschel *et al.* als eine alternative Protease hinsichtlich der Analyse von Membranproteinen gehandelt, da diese effektiv verdaut werden konnten und zudem komplementäre Ergebnisse hinsichtlich identifizierter Proteine in einer komplexen Probe im Vergleich zu dem Verdau mit anderen Proteasen wie Trypsin lieferte (95). 2005 wurden von Getie *et al.* Verdaustudien von humanem Hautelastin mithilfe dieser Elastase durchgeführt und gezeigt, dass Elastin zur massenspektrometrischen Analyse vollständig verdaut werden konnte (250). Proteolytische Elastase-Verdaue löslicher Proteine führen zur Produktion von Peptiden, die im Mittel nur ca. 1000 Da groß sind. Die anschließende Fragmentierung dieser verhältnismäßig kurzen Peptide durch CID erlaubt in den meisten Fällen die Generierung vollständiger Ionenserien, was die *de novo*-Sequenzierung erleichtert (182). Aus diesen Gründen wurde für diese Arbeit PE gewählt, um die Quervernetzung von Elastin zu untersuchen.

Um die relative Spaltspezifität zu ermitteln, wurde zunächst die Aktivität gegenüber dem löslichen Vorläuferprotein TE ermittelt. Dies diente weiterhin dazu zu zeigen, welche Aminosäuresequenzen bereits bei dem proteolytischen Verdau von TE nicht wiedergefunden werden können. Die Sequenzabdeckung hydrolysierter Proteine hängt oft von der gewählten Protease ab und kann durch zu kurze oder zu lange entstehende Peptide reduziert werden. Die Analyse der Spaltspezifität nach Keil *et al.* (238) ergab, dass bevorzugt gespalten wurde, wenn sich Leucin, Alanin, Phenylalanin, Tyrosin, Glycin oder auch Threonin und Arginin in der P1-Position befanden. Diese Werte sind in Einklang mit der von Rietschel *et al.* berechneten Spaltspezifität. Diese hatten Isoleucin, Valin, Alanin, Threonin und Leucin als die bevorzugten Aminosäuren in der P1-Position identifiziert (95). Auch dort wurde festgestellt, dass PE Peptidbindungen prinzipiell aber nach allen Aminosäuren hydrolytisch spalten kann. Die auf-



grund von hydrolysiertem TE berechnete Spaltspezifität in dieser Arbeit kann aufgrund nur eines einzelnen untersuchten Proteins nur sehr grob angegeben werden.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit ermittelt, welche Motive in der Nähe von Quervernetzungsdomänen bevorzugt gespalten werden. Dadurch war es in weiteren Experimenten möglich festzustellen, ob identifizierte quervernetzte Peptide an den gleichen Motiven gespalten waren wie TE. Dies ließ sich aufgrund der zu TE identischen Aminosäuresequenz am besten auf humanes Elastin anwenden, jedoch auch auf bovines Elastin, das eine hohe Sequenzhomologie zu dem Elastin vom Menschen aufweist (vgl. Abb. A. 1). Als Beispiel sei genannt, dass kaum lineare Peptide freigesetzt aus TE oder Elastin detektiert wurden, die C-terminal Prolin besaßen (vgl. Abb. 15). Somit konnte gleichermaßen zumindest ausgeschlossen werden, dass quervernetzte Peptide C-terminal ein Prolin besaßen.

Die Analyse der Sequenzabdeckung zeigte, dass sowohl KA-Domänen als auch der C-Terminus nicht vollständig sequenziert wurden, während KP-Domänen und hydrophobe Abschnitte vollständig abgedeckt waren (vgl. Abb. A. 4). Vermutlich führt der erhöhte Alanin-Gehalt in KA-Domänen in Kombination mit der hohen relativen Spaltspezifität von PE gegenüber Poly-Alanin-Sequenzen zu einer häufigeren Spaltung der Peptide (95). Damit sind die entstehenden Peptide zu klein, um noch verlässlich sequenziert werden zu können. Das Fehlen des C-Terminus ist lediglich dadurch zu erklären, dass auch dort die erzeugten Peptide zu klein waren, um sequenziert zu werden. Durch die Analyse von nicht verdautem TE mittels MALDI-TOF MS war zuvor gezeigt worden, dass das Protein intakt war (vgl. Abb. A. 7). So konnte ausgeschlossen werden, dass Aminosäuresequenzen durch einen frühzeitigen Translationsabbruch während der rekombinanten Expression fehlten.

### **5.1.2 Abbau von Tropoelastin und Elastin durch *Nepenthes*-Proteasen**

Der untersuchte *Nepenthes*-Proteaseextrakt, isoliert aus der Kannenpflanze *Nepenthes*, erwies sich als äußerst aktiv gegenüber TE und Aortenelastin aus *Mus musculus*, und war dazu in der Lage, beide Substrate innerhalb von Stunden proteolytisch abzubauen, wie in Abb. A. 6 gezeigt. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesem Extrakt um die Kombination aus drei Proteasen, wovon es sich bei einer um ein Enzym handelt, das, ähnlich einer Prolyl-Endopeptidase (PEP), bevorzugt dann die Peptidbindung spaltet, wenn sich Prolin in der P1-Position befindet (251,252). Die beiden anderen Proteasen, Nepenthesin-I und Nepenthesin-II, wurden bereits rekombinant hergestellt und es wurde für beide gezeigt, dass diese eine ähnlich niedrige Spaltspezifität wie PE besitzen (251,253). Bislang war bekannt, dass Elastasen lediglich von Mikroben und Tieren synthetisiert werden können (96). Bei *Nepenthes* han-

delt es sich um eine fleischfressende Pflanze, zu deren Beute neben Insekten auch kleine Wirbeltiere wie Frösche und Mäuse zählen können (254). Zur Nachahmung der natürlichen Bedingungen in der Pflanze, erfolgten die Experimente ohne vorangehende Reduktion, Alkylierung oder gar Denaturierung der Substrate. Um ein breites Spektrum an Beutetieren wie z.B. allerlei Insekten verdauen zu können, ist es für *Nepenthes L.* von Vorteil einen hochaktiven „Proteasemix“ zu besitzen, um auch schwer verdaubare Proteine abbauen zu können. Ob die elastolytischen Eigenschaften speziell dazu dienen, Elastin aus Säugetieren abzubauen, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Kleine Wirbeltiere dienen zwar auch als Beute, jedoch sind diese seltener als Insekten. Dennoch kann festgestellt werden, dass dieser Extrakt mit den Proteasen Nepenthesin-I und Nepenthesin-II analog zu dem Verdauungsenzym Pepsin bei Wirbeltieren ist. Für Pepsin wurden ebenfalls schon elastolytische Eigenschaften nachgewiesen (255). Eine tiefere Untersuchung der einzelnen Proteasen hinsichtlich des Abbaus von Elastin ist vielversprechend, da alle bislang bekannten PEPs kein Elastin abbauen, sondern lediglich in der Lage sind kurzkettige Substrate abzubauen (256). Eine  $\beta$ -Propellerdomäne fungiert vermutlich als Filter für höhermolekulare Substrate (257). Aufgrund des hohen Prolingehaltes in Elastin wäre ein proteolytischer Verdau durch ein spezifisch prolinspaltendes Enzym prinzipiell möglich.

## **5.2 Kollisionsinduzierte Dissoziation der quervernetzenden Aminosäuren Lysinonorleucin, Desmosin und Isodesmosin**

Die massenspektrometrische Identifizierung von quervernetzten Peptiden ist eine vielversprechende Methode, um Elastin strukturell näher zu charakterisieren. Da bislang keine Strategien bekannt sind, um quervernetzte Peptide in nativem Elastin anzureichern oder massenspektrometrisch spezifisch zu identifizieren, wurden zunächst die Aminosäuren LNL, DES und IDES kollisionsinduziert dissoziiert, um diese auf Reporterionen zu untersuchen. Ähnliche Ansätze werden auch bei der Identifizierung von posttranslational modifizierten Aminosäuren in Peptiden verfolgt (258). Auch gibt es strukturaufklärende Untersuchungen, in denen Peptide *in vitro* mit spezifischen Quervernetzern verknüpft wurden. In MS3D-Experimenten erzeugen die eingesetzten Quervernetzer im CID spezifische Neutralverluste oder Massendupletts und sind damit leichter zu identifizieren. Peptide, die einen solchen Neutralverlust zeigen, werden dann selektiert, fragmentiert und anschließend sequenziert (217,259).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollten zeigen, ob die natürlichen Quervernetzer LNL, DES und IDES ähnlich spezifische Ionen freigeben, die zur Identi-

fizierung von quervernetzten Peptiden genutzt werden können. AA wurde auf Grund seiner hohen Reaktivität nicht untersucht. Die Analyse ergab, dass LNL im Zuge der Erhöhung der Kollisionsenergien Fragmentationen freigibt, die auch bei nicht modifiziertem Lysin entstehen (vgl. Abb. 17). Dies ist dadurch zu erklären, dass der Bruch an den C<sub>ε</sub>-N-C<sub>ε</sub>-Bindungen in der Mitte des symmetrisch aufgebauten Moleküls einerseits protoniertes freies Lysin als Fragmentation freigibt ( $m/z$  147) oder, wenn die Ladung an dem verkürzten Teil verbleibt, protoniertes Lysin freisetzt, das um die Aminofunktion verkürzt ist ( $m/z$  130). Bei diesem Ion handelt es sich dann um protonierte Pipecolinsäure. Auch andere Arbeiten zeigen, dass diese Fragmente bei der kollisionsinduzierten Dissoziation von Lysin und anderer Lysinderivate entstehen (260,261). Bei einer Erhöhung der Kollisionsenergie auf 50 eV war nur noch ein Fragmentation von LNL bei  $m/z$  84 zu beobachten (vgl. Abb. A. 11). Es entsteht durch eine weitere Dissoziation der protonierten Pipecolinsäure mit einem Neutralverlust von 46 Da, das einem kombinierten Verlust von CO plus H<sub>2</sub>O entspricht (262). Das entstehende Ion ist ein ringförmiges Pyrrolinium-Ion mit der Summenformel [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup> und wird zu den mit Iommiumionen verwandten Fragmentationen gezählt (180,263). Somit ist auch dieses Ion nicht für LNL spezifisch, sondern wird ebenfalls von Lysin und Lysinderivaten freigesetzt. Darüber hinaus kann es auch durch die Dissoziation der zu Lysin isobaren Aminosäure Glutamin freigesetzt werden (262). Zusammenfassend betrachtet ist eine eindeutige Identifizierung von LNL-quervernetzten Peptiden auf Basis von Reporterionen nicht möglich.

Die kollisionsinduzierte Dissoziation von nicht derivatisiertem DES und IDES führte bei einer Kollisionsenergie von 40 eV, wie schon bei LNL, im unteren  $m/z$ -Bereich zu den Fragmentationen  $m/z$  84 (Pyrrolinium-Ion) und  $m/z$  130 (protonierte Pipecolinsäure) (vgl. Abb. 18). Da sich LNL und DES/IDES in ihrer Größe und Struktur unterscheiden, mussten unterschiedliche Kollisionsenergien zur Fragmentierung gewählt werden. Die Fragmentationen bei  $m/z$  84 und  $m/z$  130 sind auch hier durch die Dissoziation der C<sub>ε</sub>-N-Bindung zu erklären, wobei bei DES/IDES der Stickstoff Teil des Pyridiniumrings ist. Deshalb konnte im Gegensatz zu LNL kein Fragmentation bei  $m/z$  147 beobachtet werden. Dass die Bindung zwischen dem Pyridinium-Stickstoff und daran angehängten Alkylketten leicht dissoziierbar ist, wurde bereits bei zu Pyridin analogen Chinolin-Verbindungen beobachtet (264). Die weitere Dissoziation der protonierten Pipecolinsäure erfolgte analog zu dem oben beschriebenen Vorgang. Der simultane Verlust von CO und NH<sub>3</sub> an dem Rückgrat der vier ehemaligen Lysinreste war der zweite dominierende Dissoziationsvorgang bei DES und IDES. Die beobachteten Fragmentationen im oberen  $m/z$ -Bereich waren durch die Kombination von zwei oder mehr dieser Dissoziationen

zu erklären (vgl. Kap. 4.2.2). In Korrespondenz mit Dr. Alex G. Harrison (University of Toronto, Kanada) wurde ein Modell entwickelt, das zunächst die Bildung eines Zwitterions beschreibt. Dabei sind nur die funktionellen Gruppen von DES/IDES involviert. Dies ist möglich, weil die positive Ladung während des Dissoziationsvorgangs an dem Pyridiniumstickstoff verbleibt. Das führt zu einer negativ geladenen Carboxylgruppe und einer positiv geladenen Aminogruppe des Aminosäurerückgrates. Es kommt zu einem Neutralverlust von  $\text{NH}_3$ . Anschließend bildet der negativ geladene Sauerstoff durch einen nukleophilen Angriff auf den nebenstehenden Kohlenstoff einen Oxiranonring, von dem sich CO abspaltet (vgl. Abb. A. 27). Die um ein Kohlenstoffatom verkürzte Alkylkette besitzt weiterhin ein Sauerstoffatom, das als Aldehydgruppe vorliegt.

Die Erhöhung der Kollisionsenergie auf 95 % NE, die an dem Orbitrap-Instrument bei dem gegebenen  $m/z$ -Wert 100 eV entsprach, führte zu der Bildung einer Ionengruppe mit der allgemeinen Formel  $[\text{C}_x\text{H}_y\text{N}]^+$ , die als Reporterionen zur Identifizierung von DES/IDES diente. Diese Formel legt die Vermutung nahe, dass der Pyridiniumring während der Dissoziation stabil blieb und Neutralverluste ausschließlich an den Alkylketten entstanden. Diese Ionen wurden auch bei der weiteren Dissoziation des Ions bei  $m/z$  262 freigesetzt. Der Einsatz von HCD zur Generierung hoch aufgelöster Fragmentationenspektren bei einem Massenauflösungsvermögen von 100.000 ermöglichte die Erstellung eines Pseudo- $\text{MS}^3$ -Fragmentierungsschemas dieses Fragmentions. Es ist in Abb. A. 12 gezeigt. Die resultierenden Fragmentionen besitzen weiterhin den Pyridiniumkern sowie kleinere Alkylketten, die sich in Länge und Anzahl der ungesättigten Verbindungen unterscheiden. Somit handelt es sich auch bei den Reporterionen vermutlich um Fragmentionen, die durch die unspezifische Abspaltung von kleinen Molekülen wie  $\text{H}_2\text{O}$  oder CO an den Alkylseitenketten entstanden. Ähnliche Dissoziationsvorgänge wurden bereits für Peptide beobachtet, die mit trans-2-Hexenal modifiziert worden waren (265). Die Stabilität des Pyridiniumkerns gegenüber der kollisionsinduzierten Dissoziation wurde bereits in anderen Studien untermauert und kann durch seine Aromatizität und die intrinsische positive Ladung erklärt werden (266,267). Dass die entsprechenden Derivate von DES und IDES bei erhöhten Kollisionsenergien die gleichen Fragmentationen freigaben, ist somit schlüssig (vgl. Abb. 21). Wenn der Pyridiniumkern intakt bleibt und Dissoziationen ausschließlich an den derivatisierten Alkylketten stattfinden, führt dies mit fortschreitender Dissoziation zwangsläufig zur Bildung von Reporterionen. Ein sogenannter DESGET-Algorithmus wurde entwickelt, der das Auftreten der Reporterionen auf Basis einer Werteskala von 0 bis 1 einordnet. Konsequenterweise konnte mithilfe dieses Al-

gorithmus gezeigt werden, dass die Reporterionen nicht aus linearen Peptiden eines proteolytischen TE-Verdaus freigesetzt werden. Auch in der Literatur lassen sich keine Beispiele für Fragmentationen mit der Elementarzusammensetzung  $[C_xH_yN]^+$  ( $x = 9-13$ ;  $y = 8-18$ ) finden, die aus nicht quervernetzten Peptiden freigesetzt werden könnten (245). Daher handelt es sich um spezifische Fragmentationen zur Detektion von DES/IDES-enhaltenden Molekülen in Elastin.

## 5.3 Identifizierung und Sequenzierung von quervernetzten Peptiden in Elastin

### 5.3.1 Anreicherung tetrafunktional quervernetzter Peptide aus Elastin

Die Identifizierung der neun früh eluierenden DES/IDES-Peptide in bovinem Elastin mithilfe des DESGET-Algorithmus warf die Frage auf, ob DES/IDES-Peptide im Zuge der RP-LC-Trennung zu einem bestimmten Zeitpunkt eluieren. Bereits in einer dieser Arbeit vorangegangenen Masterarbeit konnte gezeigt werden, dass der DES/IDES-Gehalt in früh eluierenden Fraktionen deutlich erhöht ist. Hierzu wurden die gesammelten Fraktionen eingengt und einer Totalhydrolyse unterzogen, um alle entstehenden Peptidbindungen zu hydrolysieren und so ungebundenes DES/IDES freizusetzen (229). Um zu überprüfen, ob quervernetzte Peptide ausschließlich so früh eluieren, wurde eine DIA-Methode entwickelt, die es erlaubte, alle eluierenden DES/IDES-Peptide in hydrolysiertem Elastin aus *HSA*, *BTA* und *XTR* zu identifizieren. Es handelt sich um eine Möglichkeit der qualitativen Erfassung einer bestimmten Aminosäure basierend auf Reporterionen, ohne dass eine vorherige Totalhydrolyse notwendig ist. Ähnliche DIA-Methoden existieren für die verwendeten Orbitrap-Hybridinstrumente zur Sequenzierung von Peptiden unter Verwendung niedrigerer Kollisionsenergien (268). Eine direkte Zuordnung des freigesetzten Fragmentions  $m/z$  144,0808 zu spezifischen Vorläuferionen war nicht möglich, weil das Fragmention zeitgleich aus vielen verschiedenen Spezies freigesetzt wurde. Durch das zyklische Durchlaufen des  $m/z$ -Fensters von 350-1250 in 100 Th-Schritten, konnte das Fenster der DES/IDES-enhaltenden Peptide dennoch auf den Masse-zu-Ladungsbereich von  $m/z$  350-950 eingegrenzt werden. In Elastin aus *BTA* und *HSA* eluierten DES/IDES-Peptide auch bereits vor der Detektion linearer Peptide. Diese eluierten bei Elastin aus *XTR* erst dann, wenn auch lineare Peptide eluierten. Die Anreicherung quervernetzter Peptide mittels RP-LC und anschließender Fraktionierung ermöglichte für *BTA* und *HSA* die Identifizierung von insgesamt vier tetrafunktional quervernetzten Peptiden, die sich aus-

schließlich aus Peptiden aus KA-Domänen zusammensetzten. Bei Elastin aus *XTR* wurden auf diese Art keine tetrafunktional quervernetzten Peptide identifiziert (vgl. Abb. 22).

KA-Domänen falten sich aufgrund des hohen Alaningehaltes nativ zu  $\alpha$ -helikalen Konformationen (247). Diese Konformation wird durch den DES/IDES-Ring stabilisiert. Durch die enge Faltung und geringe Dynamik der Domäne können diese Peptide kaum noch Interaktionen mit dem C18-Resin-Säulenmaterial und eluieren somit sehr früh. Zusätzlich verstärkt wird dieser Effekt durch die extreme Hydrophilie von DES/IDES. Zur Analyse von freiem DES/IDES via LC ist wegen dieser extremen Hydrophilie oftmals ein hochkonzentrierter Einsatz von Ionenpaarreagenzien notwendig, um die Retentionszeit zu verlängern (82,225,269). KP-Domänen, die durch DES/IDES quervernetzt sind, tendieren im linearen Zustand eher zur Ausbildung von  $\beta$ -Schleifen und in geringerem Maße zu Polyprolin-II-helices (270). Aufgrund der weniger kompakten Struktur eluieren quervernetzte KP-Domänen möglicherweise später. Dies würde weiter erklären, warum bei hydrolysiertem Elastin aus dem tropischen Krallenfrosch, dessen TE1-Sequenz fast ausschließlich KP-Domänen enthält, erst zu späteren Zeitpunkten DES/IDES-Peptide eluierten.

Da bei dieser geringen Retentionszeit noch keine linearen Peptide eluieren (vgl. Abb. 23), konnten die quervernetzten Peptide mittels flüssigkeitschromatographischer Fraktionierung angereichert werden. Die Mitanreicherung von linearen Peptiden würde u.U. zu Ionensuppressionseffekten führen (271,272). Außerdem führen hoch abundante Peptide schnell zu einer Sättigung des Massenspektrometers (Orbitrap Fusion Tribrid MS), dessen dynamischer Bereich nur ungefähr fünf Größenordnungen beträgt. Zu einer umfassenderen Identifizierung müssten DES/IDES-Peptide global angereichert werden. Das bedeutet, dass nicht nur die früh eluierenden Peptide angereichert werden, sondern alle DES/IDES-Peptide. In Proteomics-Studien werden teilweise deswegen hoch abundante Proteine wie Albumine vor der massenspektrometrischen Analyse durch Affinitätschromatographie entfernt, um so niedrig abundante Proteine identifizieren zu können (273).

Die Analyse von intrinsisch quervernetzten Peptiden aus Kollagen findet seit den letzten Jahren ebenfalls durch den Einsatz von hochauflöser Massenspektrometrie statt (274). Kollagen und Elastin unterscheiden sich hinsichtlich der Quervernetzungen darin, dass Lysinreste in Kollagen nur bifunktional oder trifunktional quervernetzt vorliegen können und darüber hinaus partiell hydroxyliert sind (275). Die bifunktionalen Aminosäuren Dehydrodihydroxylysinonorleucin sowie Dehydrohydroxylysinonorleucin aus Kollagen werden durch den Einsatz von  $\text{NaB}[^3\text{H}]_4$  reduziert, durch die gebundene Radioaktivität identifiziert und durch

ein Molekularsieb angereichert (276). Zudem können durch Pyridinolin trifunktional quervernetzte Peptide durch Antikörper angereichert werden (274). Der anschließende proteolytische Verdau von Kollagen kann unter Verwendung spezifisch schneidender Proteasen und Substanzen wie CNBr, GluC oder Trypsin stattfinden, da der Quervernetzungsgrad geringer ist (274,277,278). Dies trägt zu einer einfacheren Identifizierung bei.

Eine Anreicherung von DES/IDES-Peptiden via SCX wäre prinzipiell denkbar, da der Pyridiniumring intrinsisch einfach positiv geladen ist. Im ungebundenen Zustand koeluiieren die beiden Isomere unter SCX-Bedingungen (279). In der Aminosäuresequenz von TE IF 2 sind ohne Berücksichtigung des Signalpeptides jedoch sechs Argininreste und 35 Lysinreste vorhanden. Die positive Ladung dieser Aminosäuren maskiert vermutlich Änderungen durch zusätzlich eingebrachte Ladungen von DES/IDES. Deshalb können quervernetzte Peptide nicht spezifisch über SCX angereichert werden.

Über den Einsatz monoklonaler Antikörper wäre es möglich, DES/IDES-Peptide spezifisch anzureichern. Bislang existieren jedoch keine spezifischen Antikörper für quervernetzte Elastinpeptide, sondern lediglich gegen lineare Sequenzen in Elastin und TE (280-282) sowie gegen freies DES (283). So sind monoklonale Antikörper für Sequenzen innerhalb der hydrophoben Domänen bekannt wie z.B. das abundante, bioaktive VGVAPG-Motiv (67,284). Eine Anreicherung oder Detektion von DES/IDES-quervernetzten Peptiden in Elastin durch die Messung der Absorption von Peptiden im UV-Bereich ist theoretisch denkbar. Die UV-Absorptionsspektren von DES und IDES unterscheiden sich in dem Maße, dass DES drei Absorptionsmaxima besitzt (bei 205 nm, 235 nm und 268 nm), während IDES nur zwei Maxima bei 205 nm und 280 nm besitzt (279). Da auch andere Aminosäuren in diesem Wellenlängenbereich signifikante molekulare Absorptionskoeffizienten besitzen, ist eine spezifische Detektion experimentell schwer durchführbar (285).

### **5.3.2 Anreicherung bifunktional quervernetzter Peptide aus Elastin**

Da in Elastin Peptide nicht nur durch DES/IDES, sondern auch bifunktional interpeptidal quervernetzt sein können, werden auch für diese Peptide spezielle Anreicherungsstrategien benötigt. Der Umstand, dass interpeptidal quervernetzte Peptide aus Elastin aufgrund der miteinander vernetzten Peptidketten mindestens zwei freie N-Termini besitzen, kann theoretisch genutzt werden, um diese Peptide anzureichern oder einfacher zu detektieren. Im niedrigen pH-Bereich liegen freie N-Termini meist protoniert vor, sodass eine Anreicherung wie bei DES/IDES-Peptiden via SCX prinzipiell denkbar wäre. Aber auch hier stören freie Lysin- und

Argininseitenketten, die in diesem pH-Bereich ebenfalls zweifach protoniert vorliegen. Dadurch müsste der pH-Bereich zu einer spezifischen Auftrennung sehr eng gewählt werden.

Die massenspektrometrische Unterscheidung interpeptidal quervernetzter, intrapeptidal quervernetzter und linearer Peptide ist durch den Einsatz isotopenkodierter N-terminaler Modifikationsreagenzien denkbar (286). Die Inkubation interpeptidal quervernetzter Peptide, die zwei freie N-Termini besitzen, mit einer äquimolaren Mischung der leichten und schweren Variante eines isotopenkodierten Modifikationsreagenzes führt zu einem Signaltuplett des Vorläuferions. Hierbei erfolgt die Aufspaltung im Verhältnis 1:2:1. Intrapeptidal quervernetzte Peptide und lineare Peptide werden auf Vorläuferioneneben nur ein Signalduplett mit einem Signalverhältnis von 1:1 ergeben. Auch diese Methode würde durch evtl. vorhandene freie Lysinseitenketten mit gestört werden, da diese ebenfalls modifiziert würden. Eine vorangehende Derivatisierung der Lysinseitenkette durch Methylierung ist prinzipiell denkbar, erhöht jedoch den experimentellen Aufwand und kann zu weiteren Nebenreaktionen führen, die die Auswertung zusätzlich erschweren (286,287). Alle hier diskutierten Anreicherungsstrategien für interpeptidal quervernetzte Peptide erlauben generell keine spezifische Anreicherung intrapeptidal quervernetzter Peptide, da diese nur über einen N-Terminus verfügen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es im Moment nicht möglich ist, quervernetzte Elastinpeptide spezifischer anzureichern. Vielversprechende Möglichkeiten wären monoklonale Antikörper gegen die entsprechenden Aminosäuren.

### **5.3.3 Sequenzierung tetrafunktional quervernetzter Elastinpeptide**

Als Maßnahme zu einer generell höheren Sequenzabdeckung und zur Generierung weiterer Peptide – linear wie quervernetzt – ist der Einsatz einer Kombination von Proteasen denkbar. In diversen Studien wurde bereits gezeigt, dass durch den Einsatz verschiedener Proteasen die Sequenzabdeckung und die Identifizierungsrate von Proteinen in einer komplexen Probe signifikant gesteigert werden kann (288,289). Auch die Analyse freigesetzter linearer Peptide aus Elastin hat bereits gezeigt, dass die Sequenzabdeckung durch den Einsatz von drei verschiedenen Elastasen deutlich gesteigert wird (290).

Dennoch konnten mit den gewählten Methoden die Aminosäuresequenzen von insgesamt vier DES/IDES-Peptiden massenspektrometrisch ermittelt werden. Für bovines und humanes Elastin konnten jedoch deutlich mehr Fragmentationenspektren akquiriert werden, die einen DESGET-Wert von  $\geq 0,9$  aufwiesen, die aber nicht eindeutig sequenziert werden konnten. Dies liegt daran, dass oftmals die Qualität der Fragmentationenspektren bei 35 % NE aufgrund



eines zu niedrigen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses nicht ausreichend war, um eine eindeutige Identifizierung zu gewährleisten. Im Vergleich zu linearen Peptiden sind quervernetzte Peptide durch die hohe Anzahl kombinatorischer Möglichkeiten extrem niedrig abundant. Zusätzlich wird die Identifizierung dadurch erschwert, dass unspezifisch spaltende Proteasen nicht nur aufgrund unbekannter Termini zu Erschwernissen bei der Sequenzidentifizierung führen, sondern auch mit zunehmender Anzahl verknüpfter Domänen eine steigende Anzahl möglicher Spaltstellen einfügen können. Hierbei wächst die Anzahl an Möglichkeiten entstehender Peptide exponentiell mit zunehmender Anzahl verknüpfter Peptide.

Um in dieser Arbeit als eindeutig quervernetzt identifiziert zu werden, mussten die entsprechenden Peptide fast vollständige Ionenserien aufweisen. Darüber hinaus mussten die nicht zugeordneten Fragmentationen im Spektrum als Kombination von mehreren Dissoziationen erklärt werden können (vgl. Abb. 33 und Abb. 26). Das Fragmentationenspektrum von DES/IDES-quervernetzten Peptiden unterschied sich bei einer Kollisionsenergie von 35 % NE deutlich von linearen und bifunktional quervernetzten Peptiden. Ein Blick in das HCD-Spektrum des DES/IDES-Peptides <sup>271</sup>KAAAKLGAGGA\_AAAAK\_KAA aus bovinem Elastin zeigt, dass neben b- und y-Ionen im unteren Masse-zu-Ladung-Bereich ausschließlich größere Fragmentationen vorlagen, die meist zwei- oder dreifach geladen waren und sich in ihrem MW maximal um wenige 100 Da von dem Vorläuferion unterschieden. Fragmentationen mit einem mittleren MW wurden fast nicht detektiert. Dies wurde bereits für *in vitro* erzeugte DES/IDES-enhaltende Peptide mittels CID an einem MALDI-TOF/TOF MS gezeigt (223) und rührt daher, dass der DES/IDES-Ring im Zuge der Dissoziation stabil bleibt und Fragmentationen durch Abspaltungen an den angehängten, meist kurzen Peptidketten entstehen (vgl. auch Kap. 4.1.2). Außerdem ist der Dissoziationsprozess von DES/IDES durch den intrinsisch positiv geladenen Pyridiniumring ladungsgesteuert. Die Vorläuferionen lagen im Zuge von ESI mehrfach protoniert vor. Zusätzlich war deshalb bei den DES/IDES-Peptiden mindestens ein mobiles Proton vorhanden, das zu der Dissoziation der Peptidbindung und somit zu den gewohnten b- und y-Ionen führte. Zwischen dem ladungsgesteuerten Dissoziationsprozess und dem durch mobile Protonen, die entlang des Peptidrückgrates wandern, wird bezüglich der Dissoziationsmechanismen von Peptiden unterschieden (291,292). Es war nicht möglich zu bestimmen, durch welches der beiden Isomere (DES oder IDES) die gefundenen Peptide vernetzt waren, da beide Moleküle im Zuge der kollisionsinduzierten Dissoziation die gleichen Fragmentationen freigeben (vgl. Kap. 4.2.1). Es konnte zwar bereits gezeigt werden, dass das Fragmentationenspektrum von ungebundenem DES und IDES weniger komplex ist, wenn

zur Dissoziation ETD gewählt wurde, allerdings finden sich keine Hinweise darauf, ob sich die beiden Aminosäuren nach ETD-basierter Dissoziation unterscheiden lassen (293). Durch die Fragmentierungsstrategie ETD könnten zukünftige Experimente komplementäre Daten über DES/IDES-quervernetzte Peptide bringen.

### **5.3.4 Tetrafunktional quervernetzter Elastinpeptide als Biomarker in der Medizin**

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode zur Identifizierung von DES/IDES-quervernetzten Peptiden, kann nicht nur zu Analyse von Elastin dienen, sondern auch dazu, quervernetzte Elastinpeptide beispielsweise im Sputum, Blut oder Urin nachzuweisen. DES/IDES wird seit Jahren als Biomarker zur Erkennung der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) diskutiert, da diese Krankheit mit dem irreversiblen Abbau von Lungenelastin einhergeht (294). Bislang kann jedoch nur ungebundenes DES/IDES quantitativ nachgewiesen werden (82,269,279,295-298). Ein kürzlich veröffentlichter Übersichtsartikel bezüglich DES/IDES als Biomarker für COPD besagt „ (...) Damit DES/IDES als eindeutige Biomarker für die Detektion des Abbaus von Lungenelastin dienen können, müssen weitere Untersuchungen deutliche Einblicke in die Verteilung innerhalb der elastischen Fasern liefern. Falls der proteolytische Abbau von Elastin bei COPD/Lungenemphysemen von pathophysiologischer Wichtigkeit dafür ist, den Zusammenhang zwischen der Menge des abgebauten Elastins und dem des freigesetzten DES/IDES zu verstehen, so ist es unverzichtbar die Lokalisierung in der elastischen Faser zu kennen.“(83).

### **5.3.5 Allgemeine Hinweise zur Sequenzierung von Elastinpeptiden**

Die Identifizierung linearer Peptide, die Lysin entweder in unmodifizierter Form oder modifiziert zu Allysin oder  $\alpha$ -Aminoadipinsäure enthielten, erfolgte in dieser Arbeit über die PEAKS-Software, die eine *de novo*-Sequenzierungsstrategie beinhaltet (203). In dieser Arbeit wurde die Modifikation von Lysin zu  $\alpha$ -Aminoadipinsäure in den Suchalgorithmus integriert. Hingegen zu Elastin aus XTR konnte für bovines Elastin kein und humanes Elastin lediglich ein Peptid identifiziert werden, das Lysin in der zu  $\alpha$ -Aminoadipinsäure modifizierten Variante trug.

Die Identifizierung von quervernetzten Peptiden durch Suchalgorithmen wurde durch eine manuelle Überprüfung der Fragmentationenspektren abgesichert. Dabei wurde berücksichtigt,

dass  $b_1$ -Ionen von Natur aus nicht bei der Dissoziation von Peptiden beobachtet werden, sofern der N-Terminus nicht acyliert ist (299). Da CID bei den verwendeten Orbitrap-Hybridinstrumenten in der linearen Ionenfalle stattfindet, unterliegen die darin gefangenen (Fragment-)Ionen dem sogenannten LMCO (Abschnitt niedriger Massen, engl. *low mass cut-off*). Dabei handelt es sich um ein Phänomen der Ionenfalle, wonach Ionen unterhalb eines bestimmten Masse-zu-Ladung-Verhältnisses nicht mehr auf stabilen Bahnen gehalten werden können, da die interne Energie zu hoch ist und die Ionen zu schnell werden (300). Der LMCO ist abhängig von dem  $q_z$ -Wert bei dem das entsprechende Vorläuferion dissoziiert wird. Bei dem  $q_z$ -Wert handelt es sich um einen Parameter, der proportional zu der applizierten Radiofrequenzspannung ist und er hängt seinerseits von dem  $m/z$ -Wert des Vorläuferions ab (300). Wird der  $q_z$ -Wert reduziert, reduziert sich auch der LMCO. Da dadurch gleichzeitig die interne Energie reduziert wird, führt dies zu einer verringerten Fragmentierung des Vorläuferions und somit zu einer geringeren Ausbeute an Fragmentationen (301). Auf Grund dessen sind in den annotierten Fragmentationenspektren kleinere Ionen, wie Immoniumionen und, abhängig vom  $m/z$ -Wert,  $b_2$ -,  $y_1$ - und  $y_2$ -Ionen nicht vorhanden. Da die Dissoziation des Analyten bei HCD nicht in der linearen Ionenfalle, sondern in einem Multipol stattfindet, ist das Phänomen bei diesen Fragmentationenspektren nicht vorhanden (302). Ebenfalls aus diesem Grund wurde die Dissoziation bei 95 % NE zur Detektion der Reporterionen von DES/IDES nicht mittels CID, sondern HCD durchgeführt.

Bei der Detektion intrapeptidal quervernetzter Peptide muss zusätzlich zu dem entstandenen Massenunterschied durch die Quervernetzung beachtet werden, dass bei Aminosäuren, die sich zwischen den beiden quervernetzten Aminosäuren befinden, keine Ionenserien beobachtet werden können. Dies ist darauf zurückzuführen, dass rein statistisch die Peptidbindung im Zuge der kollisionsinduzierten Dissoziation bei 35 % NE nur einmal bricht. Um auch diese Fragmentationen beobachten zu können, müsste sowohl eine dieser Peptidbindungen dissoziieren als auch die Quervernetzungsaminosäure oder eine andere Peptidbindung innerhalb der quervernetzten Sequenz. Dadurch war es möglich, den vernetzten Teil des Quervernetzungsmotives als simple PTM in den Suchalgorithmus zu implementieren. Dennoch konnte von Clark *et al.* für disulfidverbrückte Peptide gezeigt werden, dass diese durch CID Fragmentationen freigaben, die oft durch zweifache Brüche im Peptidrückgrat entstanden waren (303). Das wurde in der vorliegenden Arbeit teilweise auch für inter- und intrapeptidal quervernetzte Peptide beobachtet und erschwerte die Sequenzierung zusätzlich. Als Beispiel sei das KPPK-Motiv genannt, das als Quervernetzungsmotiv hoch abundant u.a. in TE1 von *XTR*

zu finden ist. Aus Tandem-massenspektrometrischen Untersuchungen von linearen prolinhaltenden Peptiden ist bekannt, dass diese Peptide abundante  $\gamma$ -Ionen erzeugen. Dies hängt mit der Spaltung der Amidbindung N-terminal zu dem Prolinrest zusammen und wird auch als Prolin-Effekt bezeichnet (304,305). Der Effekt ergibt sich aufgrund der hohen Protonenaffinität von Prolin in Kombination mit der energetisch ungünstigen Bildung eines bicyklischen Oxazolones, der entsteht, wenn die Amid-Bindung C-terminal zu Prolin gespalten wird (306,307). Aufgrund dieses Effektes wurde für diese Peptide, ob intrapeptidal quervernetzt oder linear, oft in niedriger Abundanz zusätzlich das interne  $b_2$ -PP Ion bei  $m/z$  195,1128 beobachtet. Dadurch, dass die Quervernetzungsaminosäure oftmals undissoziiert blieb, konnten damit entstehende höher abundante  $\gamma$ -Ionen beobachtet werden, die für den *de novo* Sequenzierungsalgorithmus der PEAKS-Software den Eindruck erweckten, dass sich das PP-Motiv am N-Terminus des Peptides befinden musste und nicht intern (vgl. Abb. A. 28). Durch die sich anschließende Suche mit modifizierten Datenbanken (vgl. Abb. A. 3) und den als PTMs implementierten Massenunterschieden, die durch die Quervernetzung entstanden, konnte anschließend das richtige Peptid  $^{90}\text{GKPPKPGVGGGA}$  ermittelt werden (vgl. Kap. 3.4.2). Die verwendeten Programme StavroX und PolyLinX lieferten zwar eine große Anzahl möglicher Sequenzkandidaten, jedoch erwies sich nach manueller Überprüfung ein Großteil der Kandidaten als falsch. Generell ist eine Auswertung mittels geeigneter Algorithmen unerlässlich, um die großen Datenmengen verarbeiten zu können. Auf bioinformatischer Seite ist in der Hinsicht noch großes Potential vorhanden, um die Auswertung noch weiter zu beschleunigen oder gar vollautomatisch ablaufen zu lassen. Gerade hinsichtlich der Interpretation der Daten, gewonnen aus proteolytischen Elastinverdauen, war es oft noch nötig, die Spektren manuell zu überprüfen oder *de novo* zu sequenzieren, sofern es sich um ein tetrafunktional quervernetztes Peptid handelte. Quantitative Aussagen hinsichtlich der Involvierung in Quervernetzungen von spezifischen Lysinresten und Domänen lassen sich nicht treffen. Dies lässt sich in MS3D-Experimenten bislang auch nur durch den Einsatz isotopenkodierter Quervernetzter bewerkstelligen und kann auf Elastin somit nicht angewendet werden (308,309).

## 5.4 Strukturelle Charakterisierung von nativem Elastin

Hinsichtlich des molekularen Aufbaus von nativem Elastin als Kern elastischer Fasern ist wenig bekannt. Eine der wichtigsten Eigenschaften von Elastin ist der hohe Grad der Quervernetzung der einzelnen Domänen untereinander. Studien, die sich mit der Identifizierung

quervernetzter Peptide in Elastin beschäftigten, mussten sich aufgrund technischer Limitierungen auf einzelne Peptide beschränken. Diese wurden in einem arbeitsintensiven Prozess angereichert, die reduzierbaren Quervernetzungsaminosäuren durch radioaktiv markiertes Borhydrid reduziert und anschließend durch Edman-Abbau identifiziert (240,310). Die letzte dazu durchgeführte Studie stammt aus dem Jahr 1995 und wurde an durch  $\text{Cu}^{2+}$ -Mangel nur unvollständig quervernetzter Schweineaorta (*Sus scrofa*) durchgeführt (110). Technische Limitierungen führten dazu, dass die Identifizierung quervernetzter Peptide in Elastin als zu aufwändig galt.

Die massenspektrometrische Analyse ist diesen Analysetechniken jedoch aufgrund der weit höheren Sensitivität, Geschwindigkeit und Selektivität deutlich überlegen (274). Die vorliegende Arbeit hatte deshalb zum Ziel, ein möglichst vollständiges Bild über die Quervernetzungen in Elastin zu gewinnen und damit erstmals allgemeingültige Aussagen über den molekularen Aufbau von Elastin treffen zu können. Aorten- bzw. Lungenelastin wurde gewählt, da dort der Elastingehalt mit am höchsten ist. Um die Identifizierung nicht noch weiter zu erschweren, ist es notwendig, dass das untersuchte Elastin möglichst intakt und rein ist und möglichst wenig andere Proteine enthalten sind. Dies wurde durch die schonende Isolationsmethode gewährleistet (98,311). Durch *spectral counting* wurde die Reinheit massenspektrometrisch überprüft. Sie lag bei allen untersuchten Elastinproben über 90 %. Obwohl verschiedene Organismen untersucht wurden, können die Ergebnisse dennoch unmittelbar miteinander verglichen werden. Nach der oxidativen Desaminierung von Lysin durch LOX und Enzyme der LOXL-Familie, ist die Ausbildung der Quervernetzungen ein spontaner Prozess, der bei allen Organismen aufgrund der Reaktivität des Allylsins chemisch betrachtet gleich abläuft. Keine weiteren Enzyme sind bei der Ausbildung der Quervernetzungen involviert. Erkenntnisse über die Ausbildung von Quervernetzungen lassen Rückschlüsse auf ein allgemeines Modell zur Quervernetzung von Elastin zu und somit auch über die Struktur. Auf diese Weise können allgemeingültige Aussagen bzgl. der Rolle von KA- und KP-Domänen in Elastin auch für phylogenetisch weit entfernte Organismen getroffen werden.

Die Analyse der freigesetzten linearen Peptide hatte ergeben, dass Prolinreste partiell hydroxyliert vorlagen. Bei dem hydroxylierten Motiv handelte es sich mit einer Ausnahme ausschließlich um das xPG-Motiv. Bei humanem Elastin lagen 37 % der identifizierten Prolinreste partiell hydroxyliert vor, bei bovinem 23 % und bei Elastin aus dem tropischen Kralenfrosch 29 %. Laut Sandberg *et al.* ist der Grad der Prolinhydroxylierung in Elastin variabel und schwankt zwischen 0 % und 33 % (312). Bei Hydroxyprolin handelt es sich wahrschein-

lich strukturell, wie bei Kollagen auch, um (2S, 4R)-4-Hydroxyprolin. Der genaue Grund für die partielle Hydroxylierung in Elastin ist noch nicht verstanden, aber eine aktuelle Studie zeigt, dass durch die partielle Hydroxylierung die proteolytische Resistenz gesteigert wird (100). Vergleicht man das Ergebnis dieser Arbeit mit einer 2005 durchgeführten Studie über humanes Hautelastin, war der Grad der Hydroxylierung in der vorliegenden Arbeit geringfügig höher (255). Möglicherweise wird die erhöhte Stabilität von dem untersuchten Aortenelastin gegenüber Elastin aus der Haut auch durch einen höheren Hydroxylierungsgrad erreicht.

Der Umstand, dass in keiner Elastinprobe Peptide identifiziert werden konnten, die das C-terminal liegende RKRK-Motiv (*HSA* und *BTA*) oder das RRRK-Motiv (*XTR*) trugen, wurde in einer anderen Studie ebenfalls beobachtet. Dort wurde gezeigt, dass dieses Motiv nur noch zu ca. 0,2 % der erwarteten Menge vorhanden ist (313). Bekannt ist, dass TE durch das RKRK-Motiv mit Integrin  $\alpha_v\beta_3$  interagiert (73). Darüber hinaus sind sowohl das RKRK-Motiv als auch die enthaltene Disulfidbrücke essentiell, um die Bindung zu Fibrillin-1 und MAGPs zu vermitteln und somit die Assemblierung elastischer Fasern zu induzieren (314). Bislang weiß man aber noch nicht, ob dieses Motiv im Zuge der Elastogenese als eine Art C-terminales Propeptid danach proteolytisch abgespalten wird oder mit anderen Proteinen dauerhaft interagiert.

Bei Elastin aus *XTR* sind im Gegensatz zu bovinem und humanem Elastin zwei Elastin-gene bekannt. Im Rahmen der durchgeführten Experimente wurde lediglich TE1 gefunden. Dies stimmt mit Untersuchungen von Miao *et al.* überein, die in Lungenelastin von *XTR* durch Immunfärbung zum Großteil TE1 identifiziert hatten. Geringe Mengen von TE2 wurden lediglich in den Kapillaren der Lungenwand identifiziert (231). Es sind bislang keine Spleißvarianten bekannt. In isoliertem Elastin aus *HSA* und *BTA* fand sich ebenfalls ausschließlich eine IF wieder. Dies war bei Elastin aus *HSA* IF 2 und aus *BTA* IF 1. Dies ist in Einklang mit früheren Studien, die an humanem Elastin durchgeführt wurden (98,255). Zu *BTA*-Elastin existieren in Bezug darauf keine systematischen Studien. Obwohl verschiedene Isoformen von humanem TE bekannt sind, konnte die Hypothese noch nicht bestätigt werden, dass die diversen Isoformen in unterschiedlichen Geweben unterschiedlich stark exprimiert werden.

### 5.4.1 Quervernetzungen in Elastin – Allgemeine Aussagen

Um einen umfassenden Einblick in das Quervernetzungsmuster von Elastin zu erhalten, wurden ungerichtete hochaufgelöste LC-MS-Analysen durchgeführt. Der Fokus lag nicht ausschließlich darauf, quervernetzte Peptide in Elastin massenspektrometrisch identifizieren zu können, sondern auch die posttranslational modifizierten und unmodifizierten Lysine linearer Peptide zu identifizieren. Dies liefert ebenfalls wichtige Erkenntnisse hinsichtlich des molekularen Aufbaus von Elastin. Die Tatsache, dass bei Elastin aus *HSA*, *BTA* und *XTR* in fast jedem Fall die vorhandenen KP-Domänen auch unmodifiziert gefunden wurden (vgl. Abb. 28, Abb. 34 und Abb. 39), zeigt, dass es im Zuge der Ausbildung von Quervernetzungen Domänen gibt, die weder oxidativ desaminiert werden, noch durch die Reaktion mit anderen Allysinen in Quervernetzungen eingebunden werden. Dabei ist dies nicht spezifisch für eine bestimmte Domäne, sondern kann partiell beobachtet werden: In anderen TE-Molekülen desselben Gewebes können diese dann wiederum quervernetzt sein. Vermutlich sind in den betreffenden TE-Molekülen die Lysinreste anderer Domänen dennoch in Quervernetzungen eingebunden, weil nur quervernetzte Bestandteile über die gewählte Isolationsmethode angereichert werden. Lösliche Bestandteile werden durch die wiederholten Waschschrte abgetrennt.

Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals freies Allysin als Teil eines Peptides in humanem Elastin beobachtet werden. Dabei handelte es sich um Lya178 aus der Domäne 10 mit dem <sup>176</sup>KPK-Motiv. Das zweite Lysin dieses Motivs, K176 wurde im gleichen Peptid als nicht modifiziertes Lysin identifiziert. Möglich ist, dass die beiden Aminosäuren durch das dazwischenliegende Prolin konformationell keine allzu hohe Neigung dazu haben, eine intra-peptidale Quervernetzung durch LNL auszubilden. Trotzdem war die Affinität zwischen Lya178 und K176 ausreichend hoch, um in anderen Fällen eine Quervernetzung auszubilden. So wurde diese Quervernetzung als Teil des Peptides (vgl. Abb. 31 A) <sup>174</sup>GVKKPKAPGVGGA identifiziert. Die Ausbildung von Quervernetzungen in Elastin scheint demnach kein spezifisch gesteuerter Prozess zu sein, der in ein und derselben Domäne immer zu ein und demselben Ergebnis führen muss.

Das einzige vor dieser Studie eindeutig identifizierte quervernetzte Peptid war aus nicht vollständig quervernetztem porcinem Elastin gewonnen worden. Dabei waren die KA-Domänen 19 und 25 durch DES/IDES antiparallel zueinander quervernetzt. Der dritte Lysinrest dieser Domänen war zusätzlich durch LNL mit den beiden Lysinen aus Domäne 10 quervernetzt. Es handelte sich somit um eine Quervernetzung, in der die drei Domänen interpeptidal quervernetzt waren (110). Dieses Ergebnis, in Verbindung mit den hier erhaltenen Daten

hinsichtlich Domäne 10, unterstreicht die Hypothese, dass spezifische Lysinreste in Elastin nicht einen spezifischen Bindungspartner haben, sondern sich durch spontane Kondensationen vielfältige Quervernetzungen ausbilden können. Nichtsdestotrotz haben beide Quervernetzungsprodukte der Domäne 10 gemeinsam, dass die Lysinseitenketten durch LNL quervernetzt waren.

$\Delta$ -LNL ist *in vivo* durch weitere Kondensation mit einem AA dazu in der Lage DES/IDES auszubilden, wohingegen LNL nicht mehr reaktiv ist (241). Aufgrund der Tatsache, dass LNL ein symmetrisches Molekül ist, kann im Nachhinein nicht mehr bestimmt werden, welche der beiden Lysinseitenketten ursprünglich zu Allysin modifiziert worden war. Auch aus der Identifizierung weiterer intrapeptidal quervernetzter Peptide lassen sich keine exakten Regelmäßigkeiten ableiten. So fand sich LNL als Quervernetzungsaminosäure für KP<sub>x</sub>K-, KPPK- und KAAK-Motive. Zu intrapeptidal quervernetzten Peptiden in Elastin gibt es derzeit noch keine Studien, die sich mit den hier gewonnen Erkenntnissen vergleichen ließen.

Bei Elastin aus *XTR* konnte Domäne 11 mit dem seltenen KQK-Motiv ebenfalls als intrapeptidal quervernetzt identifiziert werden. Dies geschah unter Ausbildung von AA. Da zur Ausbildung von AA zwei Allysinseitenketten miteinander kondensieren, mussten zuvor zwangsläufig beide Lysinseitenketten oxidativ desaminiert worden sein.

#### **5.4.2 Die Rolle von KP- und KA-Domänen in Elastin bezüglich ihrer Involvierung in bi- und tetrafunktionale Quervernetzungen**

Die vorherrschende Meinung hinsichtlich der Rolle von KP- und KA-Domänen in Elastin ist die, dass KP-Domänen bifunktionale Quervernetzungen ausbilden, während die KA-Domänen DES/IDES durch Kondensation mit anderen KA-Domänen formen (101). So wurden in einigen Studien bereits Anhaltspunkte dafür gefunden, dass DES/IDES-enhaltende Peptide C-terminal Aminosäuren und Sequenzmotive enthalten, die nur in KA-Domänen zu finden sind (241,315). In humanem und bovinem Elastin lassen sich die KA-Domänen in KAAKA- und AKAAX-Motive gliedern, wobei x eine große hydrophobe Aminosäure ist. Es wird vermutet, dass die drei Lysine, auf die C-terminal ein Alanin folgt, oxidativ desaminiert werden, während das Lysin, das C-terminal ein Phenylalanin oder Tyrosin trägt, unmodifiziert bleibt. Dadurch ist zunächst die Ausbildung eines durch  $\Delta$ -LNL oder AA intrapeptidal vernetzten Peptides möglich. Dass die Oxidationsrate von Lysinseitenketten durch LOX und LOXL von den sie umgebenden Aminosäuren abhängt, wurde bereits gezeigt. C-terminal liegende Alanine begünstigen laut Kagan *et al.* die Oxidation, während Aminosäuren mit gro-



ßen Seitenketten wie Tyrosin, Phenylalanin, Valin oder Leucin dies nicht tun. Die Oxidationsrate nimmt in der folgenden Reihenfolge der Substrate ab: (Val,Lys)<sub>n</sub>, (Leu,Lys)<sub>n</sub>, (Lys)<sub>n</sub>, (Phe,Lys)<sub>n</sub>, (Tyr,Lys)<sub>n</sub> (316). Die Kondensation von AA und LNL führt in diesem Modell anschließend zur Bildung von DES/IDES. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass KA-Domänen eine  $\alpha$ -helikale Konformation einnehmen, die es erlaubt, die Lysinseitenketten auf derselben Seite zu platzieren (247). Hierdurch ließ sich auch das in humaner Aorta identifizierte DES/IDES-Peptid strukturell charakterisieren (vgl. Abb. 33). MD-Simulationen an dem *in vitro* quervernetzten Peptid SAAKVAAKAQLR (vgl. Abb. 16) unterstützen diese Hypothese.

Die Analyse intrapeptidal quervernetzter Peptide relativiert diese Aussage jedoch. Es wurde bei allen untersuchten Elastinproben zwar kein durch AA intrapeptidal quervernetztes Quervernetzungsmotiv beobachtet, bei dem einer der beiden Lysinreste N-terminal zu Phenylalanin oder Tyrosin lag. Diese Peptide waren ausschließlich durch LNL intrapeptidal quervernetzt, was der oben genannten Hypothese entspricht. Dennoch fanden sich zwei Peptide, die durch AA verknüpft waren, obwohl Lysinreste N-terminal von Leucin oder Isoleucin waren (vgl. Abb. 29 und Abb. 24). Der These, dass die Ausbildung durch DES/IDES ausschließlich durch obigen Mechanismus erfolgt, widerspricht weiterhin, dass besonders bei TE1 aus *XTR*, das generell die meisten intrapeptidal quervernetzten Peptide aufwies, fast alle Quervernetzungsmotive sowohl durch LNL als auch durch AA quervernetzt waren. Auch die KP-Domäne 8 aus humanem Elastin kann sowohl über LNL als auch über AA vernetzt sein. In Einklang mit der von Kagan *et al.* erstellten These wurden KAAAKA-Domänen intrapeptidal ausschließlich als durch AA quervernetzt identifiziert. Die erhaltenen Ergebnisse sprechen somit dafür, dass Lysinreste in Nachbarschaft zu nicht sperrigen Aminosäuren auch *in vivo* bevorzugt durch LOX/LOXL modifiziert werden. Wichtig ist hierbei zu beachten, dass dies nicht ausschließlich gilt und auch z.B. Lysinreste N-terminal von Phenylalanin modifiziert werden können, was zu der Heterogenität des Quervernetzungsmusters beiträgt.

Bei intrapeptidal quervernetzten Peptiden in Elastin handelt es sich um Strukturen, die zwar die Sekundärstruktur für einen kleinen Bereich des Proteins stabilisieren, dennoch keinen Beitrag zur Quervernetzung von Elastin leisten. Diese hatten sich allein aufgrund spontaner Reaktionen von Allysinen mit anderen Lysinen oder Allysinen ausgebildet. Sind diese nicht in räumlicher Nähe zu anderen intrapeptidalen Quervernetzungen, kann sich kein DES/IDES ausbilden und die intrapeptidale Quervernetzung bleibt im reifen Elastin (isoliertes

humanes Elastin stammte von einem 69-jährigen Patienten), möglicherweise ungewollt, bestehen. Das Resultat ist ein äußerst heterogen aufgebautes Biopolymer.

So lassen die erhaltenen Ergebnisse aus *BTA*-Elastin darauf schließen, dass K64 aus der KP-Domäne 4 zu dem Peptid AKAA sowohl durch AA als auch LNL quervernetzt war. Darüber hinaus war dieser Lysinrest durch LNL noch zu dem Peptid KF interpeptidal quervernetzt und lag intrapeptidal quervernetzt und unmodifiziert vor. Diese hohe Anzahl verschiedener Modifikationen für einen spezifischen Lysinrest ist in allen untersuchten Gewebeproben gefunden worden. Bei humanem Elastin war die Domäne 13 mit den KA-Domänen 6 und 14 verbunden. Weiterhin wurden diverse mit Domäne 13 verbundene Peptide identifiziert, bei denen eine eindeutige Domänenzuordnung nicht möglich war. Gleiches galt für viele weitere interpeptidal quervernetzte Peptide aus bovinem Aortenelastin (vgl. Tab. A. 7). Die gängige Hypothese, dass KP-Domänen meist mit anderen KP-Domänen interpeptidal verbunden sein sollten (101) und mit sich selbst aufgrund sterischer Hinderung keine intrapeptidalen Quervernetzungen ausbilden können, kann mit diesen Daten klar widerlegt werden. Insbesondere die Tatsache, dass KP-Domänen zu KF- oder KY-Dipeptiden bifunktional quervernetzt waren, zeigt, dass die KAAKF- und KAAKY-Motive nicht ausschließlich nur DES und IDES formen. Die Tatsache, dass sowohl KA- als auch KP-Domänen durch AA und LNL intrapeptidal quervernetzt sein können, bedeutet nach dem Bildungsmechanismus von DES/IDES, dass beide rein theoretisch dazu in der Lage wären DES und IDES auszubilden. Möglicherweise ist die Kondensation zweier KP-Domänen dennoch durch die Sekundärstruktur dieser Domänen im Gewebe nicht begünstigt (317). Dagegen spricht allerdings, dass Baig *et al.* bei der Analyse bovinen Aortenelastins ein DES/IDES-enhaltendes Peptid identifiziert hatten, das entweder Teil von der KP-Domäne 4 oder 8 war (318).

Jedoch fand sich bei *XTR*-Elastin eine große Anzahl intrapeptidal quervernetzter KPPK-Motive (vgl. Tab. A. 10). Auch bei Elastin aus *BTA* wurden insgesamt 7 verschiedene Peptide entdeckt, die innerhalb dieses Motivs in Domäne 35 intrapeptidal durch LNL quervernetzt waren (vgl. Tab. A. 4). Dies zusammengenommen legt nahe, dass KPPK-Domänen in Elastin, nur bedingt dazu geeignet sind intermolekulare Quervernetzungen auszubilden und somit nicht entscheidend zur Quervernetzung und somit zur Stabilität des Biopolymers beitragen. Von den insgesamt vier identifizierten tetrafunktional quervernetzten Peptiden waren drei Peptide aus drei Peptidketten aufgebaut. Mittels molekularem Docking konnte nachgewiesen werden, dass das dritte Peptid theoretisch durch die proteolytische Spaltung innerhalb der Quervernetzung entstanden war. Bezüglich dessen konnten schon andere Studien das Potenti-

al von Elastasen nachweisen, in der Nähe von DES/IDES zu spalten (240) oder gar ungebundenes DES freizusetzen (319).

Die hier erhaltenen Ergebnisse sprechen insgesamt dafür, dass sich DES/IDES bevorzugt zwischen zwei Peptidketten aus KA-Domänen ausbilden, die paarweise angeordnete Lysinreste enthalten. Dennoch darf die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass auch drei Peptidstränge miteinander verbunden sein können. Die durchgeführten MD-Simulationen erlauben keine absolute Aussage darüber, was der Zustand dieses Peptides im nicht hydrolysierten Gewebe war. Für *in vitro* generierte DES/IDES-Peptide konnte bereits beobachtet werden, dass sich diese aus drei Peptidsträngen zusammensetzen können und die Bildung zumindest unter diesen Bedingungen möglich ist. Dennoch muss berücksichtigt werden, dass noch eine große Anzahl weiterer DES/IDES-Peptide vorhanden war, die nicht sequenziert werden konnte.

Sowohl in humanem als auch in bovinem Elastin fanden sich nach dem proteolytischen Verdau verhältnismäßig wenig lineare Peptide, die KA-Domänen abdeckten. Dies könnte damit erklärt werden, dass diese stärker in Quervernetzungen eingebunden sind als KP-Domänen, aufgrund der höheren Reaktivität von LOX und LOXL gegenüber diesen. Dennoch muss berücksichtigt werden, dass bereits in dem nicht quervernetzten TE ebenfalls viele KA-Domänen nicht als Teil von Peptiden identifiziert wurden, wie schon in Kap. 5.1.1 diskutiert. Im Zuge des Verdau mit Trypsin hingegen schon (vgl. Abb. A. 9). Der Grund dafür ist die hohe Affinität der PE gegenüber Poly-A-Sequenzen. Dies wird dadurch zusätzlich untermauert, dass interpeptidal quervernetzte KA-Domänen nur sehr wenige Alaninreste enthielten. Deren Anzahl schwankte zwischen einer und vier Aminosäuren (vgl. Tab. A. 6).

### **5.4.3 Elastin aus *Xenopus tropicalis* – Unterschiede zu Elastin aus *Bos taurus* und *Homo sapiens***

Dass in Elastin aus *XTR* nur ein interpeptidal quervernetztes Peptid identifiziert wurde, liegt vermutlich an der hohen Anzahl von KP-Domänen, die anscheinend weniger mit anderen KP-Domänen kondensieren, als KA-Domänen mit sich selbst bzw. anderen KP-Domänen (vgl. Tab. A. 8 und Tab. A. 5). Bei humanem und bovinem Elastin wurde so insgesamt nur ein Peptid identifiziert, bei dem zwei KP-Domänen interpeptidal verbunden waren (KP-Domänen 4 und 12). Für Elastin, das aufgrund einer niedrigeren LOX-Aktivität nur unvollständig quervernetzt war, wurde bereits gezeigt, dass dieses, verglichen mit intaktem Elastin,

eine verringerte Elastizität und Widerstandskraft aufgrund niedrigerer relativer Mobilität besitzt (320).

Die hohe Anzahl der KPPK-Domänen in *XTR* ist phylogenetisch vermutlich durch die mehrmalige Duplikation eines spezifischen Intron-Exon-Paares entstanden (66). Es wird diskutiert, dass das Elastin aus *XTR* schon allein aufgrund der relativ großen hydrophoben Exons eine verringerte Elastizität im Vergleich zu anderen Organismen haben sollte (231). Für einen verringerten Grad der intermolekularen Quervernetzung in *XTR* spricht die Tatsache, dass Lysine oft unmodifiziert und als Allysin oder sogar  $\alpha$ -Amino adipinsäure identifiziert wurden.

Bei  $\alpha$ -Amino adipinsäure handelt es sich um eine PTM, die bisher erst einmal qualitativ in geringen Mengen in Elastin, genauer in humanem Hautelastin, beobachtet wurde (248). Auf Peptidebene konnte diese Aminosäure bislang nicht in Elastin beobachtet werden. Der Bildungsmechanismus in Elastin ist umstritten, es handelt sich jedoch wahrscheinlich um eine Oxidation von nicht quervernetztem Allysin (321). Für Kollagen, das wie Elastin ebenfalls ein langlebiges Protein ist und in dem diese Aminosäure auch vorkommt, konnte gezeigt werden, dass die Bildung von  $\alpha$ -Amino adipinsäure beim Menschen mit fortschreitendem Alter signifikant zunimmt (322). Ob die Bildung enzymkatalysiert abläuft oder spontan geschieht, ist unbekannt. Ein möglicher Mechanismus könnte die metallkatalysierte Oxidation sein durch die Bildung von  $H_2O_2$  und mittels Elektronendonatoren wie NADH und NADPH (323). Da der untersuchte Frosch jedoch erst zwei Jahre alt war (*XTR*-Individuen können bis zu 20 Jahre alt werden), ist ein ähnlicher, altersabhängiger Mechanismus eher unwahrscheinlich. Weitere systematische Studien müssen durchgeführt werden, um die Abundanz dieser Aminosäure mit Eigenschaften von Elastin hinsichtlich der Elastizität, dem Quervernetzungsgrad oder dem relativen Alter des betreffenden Organismus zu korrelieren. Es ist möglich, dass bestehende Allysinreste in den KP-Domänen aufgrund sterischer Hinderungen keinen Bindungspartner zur Ausbildung von Quervernetzungen gefunden hatten und somit im Laufe der Zeit ungewollt oxidierten.

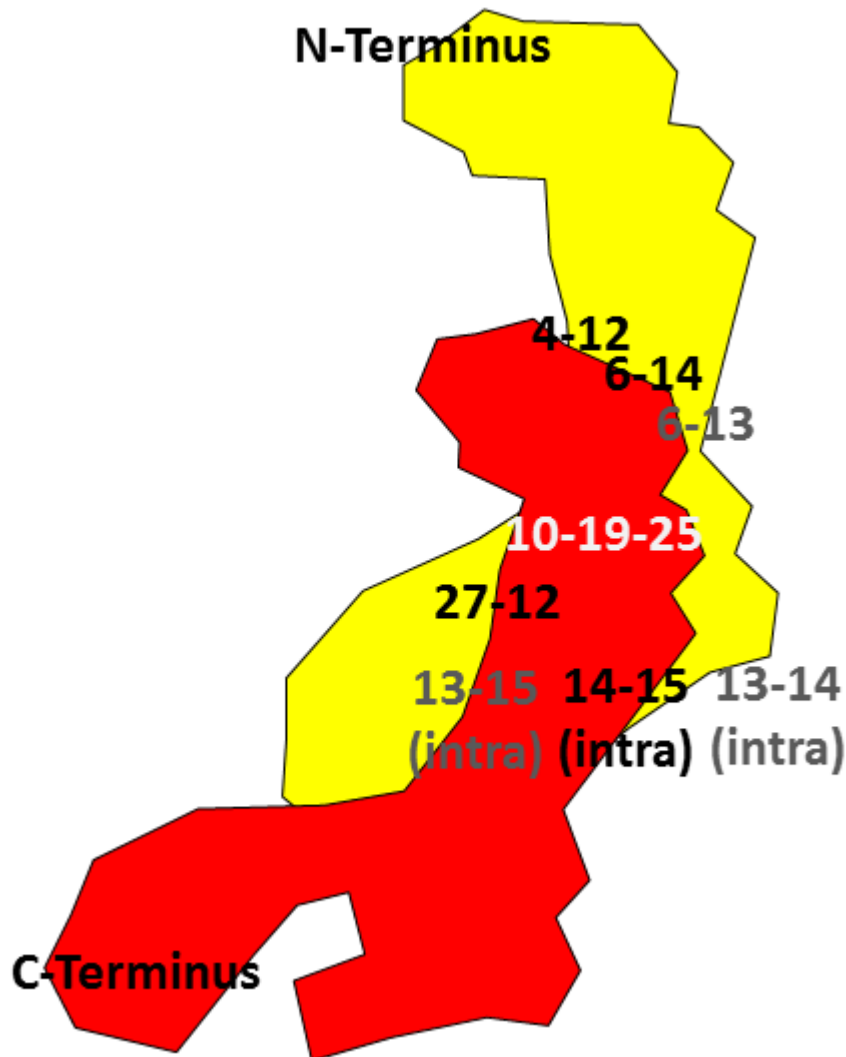
### **5.5 Weiterentwicklung des bestehenden Modells der Elastogenese**

Die erhaltenen Daten, gerade in Bezug auf die sich sehr ähnelnden TE-Sequenzen aus *HSA* und *BTA*, wurden genutzt, um das aktuelle Modell hinsichtlich der Elastogenese von humanem Elastin zu verfeinern und allgemeingültige Aussagen über den Aufbau humanen Elastins treffen zu können. Die Daten, die aus Elastin von *XTR* gewonnen wurden, können in

diesem makromolekularen Modell keine Verwendung finden, da die TE-Sequenzen zu unterschiedlich sind. Die identifizierten quervernetzten Peptide in Elastin aus *HSA* und *BTA* ähnelten sich insofern, als dass DES/IDES-Peptide aus vernetzten KA-Domänen bestanden, wovon ein Peptidstrang eine sperrige Aminosäure C-terminal von einem der ursprünglichen Lysinreste trug. Auch war ihnen gemein, dass KP-Domänen meist intrapeptidal durch LNL vernetzt waren und interpeptidale Quervernetzungen oft zwischen einer KA- und einer KP-Domäne gebildet wurden. Die Tatsache, dass keine Peptide gefunden wurden, die exakt die gleichen miteinander quervernetzten Domänen widerspiegelten, lässt sich vermutlich durch die heterogene Quervernetzung erklären. Es ist wahrscheinlich, dass sich auch bei Aortenelastin aus zwei Individuen der gleichen Art andere Quervernetzungsmuster ausbilden.

Basierend auf Daten der Oberflächenstruktur von humanem TE wurde vor kurzem von Baldock *et al.* ein Modell zur Entstehung Elastins präsentiert, das gegenwärtig viel diskutiert wird. Dabei handelt es sich um das sogenannte *head-to-tail*-Modell (109). Es wird propagiert, dass die einzelnen TE-Monomere sich entlang der Mikrofibrillen hintereinander aufreihen und anschließend der jeweils N-terminale Teil eines Monomers mit dem C-terminalen Teil des zuvor aufgereihten Monomers durch intermolekulare Quervernetzungen verknüpft wird. Ein ähnlicher Bildungsmechanismus wurde auch schon für fibrilläre Faserproteine der EZM wie Fibrillin-1 beobachtet (324). Großen Einfluss auf dieses Modell hatte die von Brown-Augsburger *et al.* identifizierte Quervernetzung zwischen den Domänen 10, 19 und 25 (110). Unter Berücksichtigung der in der vorliegenden Arbeit identifizierten interpeptidalen Peptide ergibt sich ein leicht verändertes Modell. Die in Elastin aus *BTA* identifizierten interpeptidalen Quervernetzungen zeigten Verknüpfungen der Domänen 4 mit 12, 6 mit 14, 14 mit 15 und 27 mit 12 sowie in Elastin aus *HSA* die Quervernetzungen von Domäne 13 mit 14, 13 mit 6 und 13 mit 15. Handelte es sich um ein interpeptidal quervernetztes Peptid, kann im Unterschied zu MS3D-Experimenten nicht gesagt werden, ob es in Wirklichkeit intra- oder intermolekular quervernetzt ist. Eine Unterscheidung ist dort durch Gelelektrophoresetechniken sowie Isotopenmarkierung der einzelnen Monomere möglich (325,326). Bei *in vitro* quervernetztem humanem TE wurde bereits entdeckt, dass die Domäne 14 mit Domäne 15 intramolekular quervernetzt sein kann (327). Unter der sich ergebenden Annahme, dass es sich bei den miteinander verknüpften Domänen 13, 14 und 15 im Gegensatz zu den anderen deshalb in Wirklichkeit um intramolekulare Quervernetzungen handelte, ergibt sich nun ein Modell das zwar immer noch eine *head-to-tail*-Konformation beschreibt, in der die TE-Monomere jedoch

etwas überlappter vorliegen und nicht streng hintereinander aufgereiht, wie zuvor propagiert (vgl. Abb. 40).



**Abb. 40: Modifiziertes *head-to-tail*-Modell von Elastin am Beispiel von zwei TE-Monomeren**

Die beiden TE-Monomere sind in der 2D-Darstellung rot und gelb abgebildet entsprechend Baldock *et al.* (109). Intermolekular identifizierte Domänen aus bovinem Elastin sind schwarz, aus porcinem Elastin weiß, entnommen aus Brown-Augsburger *et al.* (110), und aus humanem Elastin sind grau dargestellt. Domänen, die in dieser Arbeit zwar als interpeptidal quervernetzt identifiziert wurden, aufgrund ihrer Nähe in der Sequenz wahrscheinlich aber intramolekular quervernetzt sind, sind kenntlich gemacht.

Dass die Domänen 21 und 23, in nativem humanem Elastin auch *in vivo* miteinander verknüpft sind, so wie sie bei *in vitro* quervernetzten TE gefunden wurden, ist nicht ausgeschlossen (328). MD-Simulationen konnten in der vorliegenden Arbeit sowohl zeigen, dass durch die Ausbildung von AA in ANAO-TE die Scharnierstruktur in dieser Region stabilisiert wird, als auch die Rolle des zentral liegenden Prolinrestes untermauern (vgl. Abb. 16), wengleich

dieser nicht allein für die Ausbildung des Scharniers verantwortlich war. Das Scharnier bildete sich über das gesamte GVGTP-Motiv aus. Vorangegangene MD-Simulationen der nicht quervernetzten Variante des Peptides hatten gezeigt, dass es sich auch linear bereits in einer haarnadelähnlichen Konformation anordnet (329).

Generell muss beachtet werden, dass es sich bei dem beschriebenen *head-to-tail*-Modell um ein idealisiertes Modell handelt, das eher die anfängliche Aufreihung der TE-Moleküle beschreibt. Aufgrund fehlender hochauflösender Strukturdaten über TE lässt sich nicht mit Bestimmtheit sagen an welcher Position, welche Domäne lokalisiert ist. Das erhöht den Grad der Freiheitsgrade und führt leicht zu verfälschten Ergebnissen. Vor dem Hintergrund der weiteren identifizierten quervernetzten Peptide ist es wahrscheinlich, dass die anfängliche Organisation der TE-Monomere in der wachsenden Faser zwar kettenartig sein könnte, wie es das *head-to-tail*-Modell auch besagt, diese durch die räumliche Nähe zu lateral liegenden TE-Monomeren, die sich in ihrer Orientierung leicht unterscheiden, jedoch spontan äußerst vielfältige Quervernetzungen ausbilden können. Vorangegangene Experimente haben bereits gezeigt, dass die Entstehung von Quervernetzungen in Elastin kein schneller Prozess ist, sondern sich über mehrere Wochen hinzieht (330). Dies wurde durch ein Studie von Sato *et al.* gestützt, die propagiert, dass die Elastogenese zunächst durch die Ausbildung einiger Quervernetzungen initiiert wird und sich erst nach Alignierung der einzelnen Monomere auf den Mikrofibrillen stabile Quervernetzungen wie DES und IDES ausbilden können (331). Die in der vorliegenden Arbeit dazu durchgeführten Experimente an ANAO-TE untermauern diese These noch weiter. Dessen Analyse hatte ergeben, dass es im Vergleich zu nativem Elastin deutlich weniger quervernetzt ist (vgl. Kap. 4.1.2). Mögliche Ursachen dafür sind die im Verhältnis zur Bildung von Elastin kurze Inkubationszeit zur Ausbildung von Quervernetzungen sowie eine fehlende Ausrichtung entlang der Mikrofibrillen. Debelle *et al.* konnten darüber hinaus zeigen, dass die Peptidketten in nativem Elastin aus *BTA* zu 48 % keine bestimmte Sekundärstruktur einnehmen, sondern ungeordnet vorliegen, das für eine nicht einheitliche Quervernetzung spricht (332). In verschiedenen Abhandlungen wurde diskutiert, dass es sich bei Elastin um eine Art fraktales Substrat handelt, dessen Fernordnung über drei Größenordnungen hinweg experimentell bestätigt wurde. Das bedeutet, dass es sich um statistisch randomisierte Fraktale handeln könnte (94). Gemeint ist damit, dass sich Sequenzen und Eigenschaften von Elastin auf kleiner Ebene (repetitive Aminosäuresequenzen, z.B. Aminosäuredupletts wie GV) ebenso wiederholen wie die Anordnung von Quervernetzungsdomänen, die immer wieder durch hydrophobe Domänen unterbrochen werden und damit ein ähnliches

Muster auf verschiedenen Ebenen ergeben. Selbst für partiell hydrolysiertes Elastin, genannt  $\alpha$ -Elastin, konnte bereits nachgewiesen werden, dass es sich wie ein Fraktal zu Elastin verhält (333). Elastin scheint also zwar eine höhere Ordnung zu besitzen, diese scheint aber derart komplex zu sein, dass es sie gemittelt selbst in der Form unspezifisch hydrolysierter Peptide beibehält.

Ein weiteres Indiz für eine vielfältige und leicht ungeordnete Ausbildung von Quervernetzungen in Elastin ist die Tatsache, dass Prolinreste partiell hydroxyliert sind, was zu Konformitätsunterschieden der einzelnen TE-Monomere in der wachsenden elastischen Faser führen sollte (100). Dadurch könnte es ebenfalls zu einer veränderten Ausrichtung der Monomere untereinander kommen. TE besitzt im Gegensatz zu anderen Proteinen auch als lösliches Monomer eine hohe strukturelle Flexibilität (334). Besonders die hydrophoben Domänen liegen meist als ungeordnete Regionen oder verzerrte  $\beta$ -Faltblattstrukturen vor (109,335). Allein aufgrund dessen ist TE bereits elastisch und lässt sich bis auf das Achtfache seiner ursprünglichen Länge dehnen (109). Vor diesem Hintergrund ist es nur konsequent, dass die Quervernetzung in der gebildeten elastischen Faser ebenfalls nicht durch ein starres Muster erfolgen kann und dass Elastin durch teils zufällig geformte Quervernetzungen eine ebenfalls ungeordnete Struktur einnimmt. Bereits 1974 konnten Hovee und Flory zeigen, dass die elastischen Eigenschaften Elastins sich am ehesten durch eine unspezifische Anordnung der einzelnen Monomere erklären ließen (336). Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit auf molekularer Ebene bestätigt werden.

Zusammenfassend betrachtet ergibt sich auf Basis identifizierter Quervernetzungen für Elastin das Bild eines heterogen aufgebauten Biopolymers. Ob das *head-to-tail*-Modell hinsichtlich der Entstehung von Elastin zutrifft oder nicht, lässt sich nach wie vor nicht mit Bestimmtheit sagen. Identifizierte Quervernetzungen ließen sich jedoch mit dem Modell vereinbaren. Mit Gewissheit lässt sich dennoch sagen, dass der finale Aufbau Elastins heterogen ist und keine unmittelbare Ordnung auf dieser Ebene zu erkennen ist.



## 6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die Grundlagen zur massenspektrometrischen Analyse von quervernetzten Peptiden in nativem Elastin geschaffen und auf isoliertes Elastin aus drei verschiedenen Organismen angewendet. Diese Methoden lassen sich nun direkt auch auf Elastin aus anderen Geweben und Organismen übertragen. Das macht es möglich, dieses hochabundante und essentielle Protein auf einer neuen Ebene strukturell zu verstehen. Trotz großer Fortschritte in dieser Arbeit ist die Identifizierung von quervernetzten Peptiden in Elastin weiterhin mit Schwierigkeiten verbunden, die bei der Analyse beachtet werden müssen. Nach wie vor ist es eine große Herausforderung, unspezifisch gespaltene quervernetzte Peptide zuverlässig zu identifizieren.

Elastin ist nach Meinung des Autors das einzig bekannte Substrat, bei dem eine unspezifisch spaltende Protease gewählt werden muss, um quervernetzte Peptide analysieren zu können. Wenn sich eine spezifisch spaltende Protease fände, die Elastin hydrolytisch spalten kann, würde die Interpretation der Fragmentationenspektren um ein Vielfaches erleichtert werden. Zu einer grundsätzlich zuverlässigeren Identifizierung quervernetzter Peptide werden jedoch die rasant steigende Sensitivität, Massenauflösungsvermögen und Massengenauigkeit der Hybridmassenspektrometer weiter beitragen, da dadurch Mehrdeutigkeiten in der Spektreninterpretation noch weiter verringert werden. Grundsätzlich gilt, dass identifizierte Peptidsequenzen umso verlässlicher sind, je höher die Massengenauigkeit des verwendeten Gerätes ist. Diverse Algorithmen erleichtern die Sequenzierung von quervernetzten Peptiden zwar bereits heutzutage, dennoch musste in dieser Arbeit jedes identifizierte Fragmentationenspektrum eines möglicherweise quervernetzten Peptides noch manuell überprüft werden. Auf bioinformatischer Ebene wird die Weiterentwicklung von Algorithmen deshalb dazu führen, dass in wenigen Jahren keine Fragmentationenspektren mehr manuell überprüft werden müssen. So sind Software-Lösungen denkbar, die im ersten Schritt lineare Peptide identifizieren und in einem zweiten Schritt quervernetzte Peptide. In diesem Schritt werden jeweils nur die Spektren berücksichtigt, die nicht schon zuvor als linear identifiziert wurden. Da die existierenden Algorithmen derzeit stets getrennt voneinander arbeiten, führt dies zwangsläufig zu einer erhöhten Produktion falsch positiver Ergebnisse. Bioinformatische Fortschritte werden nicht nur die Identifizierung quervernetzter Elastinpeptide erleichtern, sondern generell die Identifizierung quervernetzter Peptide. Dies ist unabhängig davon, ob diese *in vitro* im Zuge von MS3D-Experimenten generiert wurden oder ob es sich um intrinsische Quervernetzungen von disulfidverbrückten oder anderweitig quervernetzten Proteinen handelt.

Nichtsdestotrotz wird natives Elastin immer Eigenschaften besitzen, die eine unzweifelhafte Identifizierung von quervernetzten Peptiden teilweise nicht möglich machen. Die Repetitivität innerhalb der Aminosäuresequenz von TE macht die Zuordnung von Peptiden zu einer exakten Domäne trotz hochaufgelöster und vollständig annotierter Fragmentationsspektren teilweise unmöglich. Darüber hinaus lässt sich nicht feststellen, ob als interpeptidal quervernetzt identifizierte Peptide tatsächlich intermolekular sind oder in Wirklichkeit intramolekular, also Teile desselben TE-Moleküls. Dies lässt sich nur dann mit Sicherheit sagen sofern es sich um die gleichen miteinander vernetzten Domänen handelt. Dies würde sich nur durch den Einsatz von isotoptenmarkierten TE-Molekülen im wachsenden Organismus oder Zellkulturen feststellen lassen. Die Identifizierung weiterer quervernetzter Peptide durch den Einsatz hochaufgelöster Massenspektrometrie mit entsprechender Software wird trotzdem weiterhin dazu beitragen, dem exakten Aufbau Elastins auf makromolekularer Ebene noch näher zu kommen. MD-Simulationen von quervernetzten Peptiden aus Elastin dienen dabei einem besseren Verständnis des molekularen Aufbaus nativen Elastins. Untersuchungen an weiteren Gewebetypen werden zeigen, ob eine gewebespezifische Abhängigkeit des Quervernetzungsmusters bei Wirbeltieren besteht und inwiefern der Level von  $\alpha$ -Aminoadipinsäure in Elastin als Marker für den Quervernetzungsgrad eines Gewebes dienen könnte.

Die Erkenntnisse, die in der vorliegenden Arbeit gewonnen wurden, lassen eindeutig darauf schließen, dass das Quervernetzungsmuster von Elastin unabhängig von Gewebetyp und Organismus sehr vielfältig und komplex ist. Dies ist, wie diskutiert wurde, wahrscheinlich einer der wesentlichen Faktoren dafür, dass Elastin überhaupt elastisch ist.

## 7 Literaturverzeichnis

1. van Meer, G., Voelker, D. R. und Feigenson, G. W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Bio* **9**, 112-124
2. Wickstead, B. und Gull, K. (2011) The evolution of the cytoskeleton. *J Cell Biol* **194**, 513-525
3. Fletcher, D. A. und Mullins, D. (2010) Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**, 485-492
4. Frantz, C., Stewart, K. M. und Weaver, V. M. (2010) The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* **123**, 4195-4200
5. Alberts, B., Johnson, A. und Lewis, J. (2002) The Extracellular Matrix of Animals. *Mol Biol Cell*, Garland Science, New York. 2-8
6. Mecham, R. P. (2001) Overview of extracellular matrix. *Curr Protoc Cell Biol* **Kapitel 10**, Einheit 10.1
7. Boudreau, N. und Bissell, M. J. (1998) Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 640-646
8. Badylak, S. F., Freytes, D. O. und Gilbert, T. W. (2009) Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomaterialia* **5**, 1-13
9. Schonherr, E. und Hausser, H. J. (2000) Extracellular matrix and cytokines: a functional unit. *Dev Immunol* **7**, 89-101
10. Jarvelainen, H., Sainio, A., Koulu, M., Wight, T. N. und Penttinen, R. (2009) Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* **61**, 198-223
11. Birkedal-Hansen, H. (1995) Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 728-735
12. Marieb, E. (2001) *Hum Anat & Phys*, Addison Wesley Longman
13. Gandhi, N. S. und Mancera, R. L. (2008) The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. *Chem Biol Drug Des* **72**, 455-482
14. Jackson, R. L., Busch, S. J. und Cardin, A. D. (1991) Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev* **71**, 481-539
15. Yanagishita, M. (1993) Function of Proteoglycans in the Extracellular-Matrix. *Acta Pathol Japon* **43**, 283-293
16. Kiani, C., Chen, L., Wu, Y. J., Yee, A. J. und Yang, B. B. (2002) Structure and function of aggrecan. *Cell Res* **12**, 19-32

17. Wu, Y. J., La Pierre, D. P., Wu, J., Yee, A. J. und Yang, B. B. (2005) The interaction of versican with its binding partners. *Cell Res* **15**, 483-494
18. Rauch, U., Feng, K. und Zhou, X. H. (2001) Neurocan: a brain chondroitin sulfate proteoglycan. *Cell Mol Life Sci* **58**, 1842-1856
19. Kuschel, C., Steuer, H., Maurer, A. N., Kanzok, B., Stoop, R. und Angres, B. (2006) Cell adhesion profiling using extracellular matrix protein microarrays. *Biotechniques* **40**, 523-531
20. Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J. und Smith, J. W. (2000) Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* **275**, 21785-21788
21. Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D. L., Joachimiak, A., Goodman, S. L. und Arnaout, M. A. (2001) Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* **294**, 339-345
22. Danhier, F., Le Breton, A. und Preat, V. (2012) RGD-based strategies to target alpha(v) beta(3) integrin in cancer therapy and diagnosis. *Mol Pharm* **9**, 2961-2973
23. D'Souza, S. E., Ginsberg, M. H. und Plow, E. F. (1991) Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends Biochem Sci* **16**, 246-250
24. Humphries, J. D., Byron, A. und Humphries, M. J. (2006) Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* **119**, 3901-3903
25. Ricard-Blum, S. (2011) The Collagen Family. *CSH Perspect Biol* **3**
26. Shoulders, M. D. und Raines, R. T. (2009) Collagen Structure and Stability. *Annu Rev Biochem* **78**, 929-958
27. Brodsky, B. und Persikov, A. V. (2005) Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem* **70**, 301-339
28. Ushiki, T. (2002) Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch Histol Cytol* **65**, 109-126
29. Gorres, K. L., Edupuganti, R., Krow, G. R. und Raines, R. T. (2008) Conformational preferences of substrates for human prolyl 4-hydroxylase. *Biochemistry* **47**, 9447-9455
30. Gorres, K. L. und Raines, R. T. (2010) Prolyl 4-hydroxylase. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **45**, 106-124
31. Holmgren, S. K., Taylor, K. M., Bretscher, L. E. und Raines, R. T. (1998) Code for collagen's stability deciphered. *Nature* **392**, 666-667
32. Eyre, D. R., Paz, M. A. und Gallop, P. M. (1984) Cross-linking in collagen and elastin. *Annu Rev Biochem* **53**, 717-748
33. Kielty, C. M., Sherratt, M. J. und Shuttleworth, C. A. (2002) Elastic fibres. *J Cell Sci* **115**, 2817-2828

34. Schmelzer, C. E. H. (2016) Assembly and Properties of Elastic Fibers. in *Elastic Fiber Matrices: Biomimetic Approaches to Regeneration and Repair*. 1-22
35. Berry, C. L., Looker, T. und Germain, J. (1972) Nucleic acid and scleroprotein content of the developing human aorta. *J Pathol* **108**, 265-274
36. Shapiro, S. D., Endicott, S. K., Province, M. A., Pierce, J. A. und Campbell, E. J. (1991) Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *J Clin Invest* **87**, 1828-1834
37. Mecham, R. P., Levy, B. D., Morris, S. L., Madaras, J. G. und Wrenn, D. S. (1985) Increased Cyclic-Gmp Levels Lead to a Stimulation of Elastin Production in Ligament Fibroblasts That Is Reversed by Cyclic-Amp. *J Biol Chem* **260**, 3255-3258
38. Papke, C. L. und Yanagisawa, H. (2014) Fibulin-4 and fibulin-5 in elastogenesis and beyond: Insights from mouse and human studies. *Matrix Biol* **37**, 142-149
39. Bedell-Hogan, D., Trackman, P., Abrams, W., Rosenbloom, J. und Kagan, H. (1993) Oxidation, cross-linking, and insolubilization of recombinant tropoelastin by purified lysyl oxidase. *J Biol Chem* **268**, 10345-10350
40. Moon, H. J., Finney, J., Ronnebaum, T. und Mure, M. (2014) Human lysyl oxidase-like 2. *BioorgChem* **57**, 231-241
41. Ramirez, F. (2000) Pathophysiology of the microfibril/elastic fiber system: introduction. *Matrix Biol* **19**, 455-456
42. Sage, H. und Gray, W. R. (1979) Studies on the evolution of elastin--I. Phylogenetic distribution. *Comp Biochem Physiol* **64**, 313-327
43. Davis, M. R. und Summers, K. M. (2012) Structure and function of the mammalian fibrillin gene family: Implications for human connective tissue diseases. *Mol Genet Metab* **107**, 635-647
44. Reinhardt, D. P., Chalberg, S. C. und Sakai, L. Y. (1995) The structure and function of fibrillin. *Ciba F Symp* **192**, 128-147
45. Pyeritz, R. E. (2000) The Marfan syndrome. *Annu Rev Med* **51**, 481-510
46. Nagase, T., Nakayama, M., Nakajima, D., Kikuno, R. und Ohara, O. (2001) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res* **8**, 85-95
47. Jensen, S. A., Reinhardt, D. P., Gibson, M. A. und Weiss, A. S. (2001) Protein interaction studies of MAGP-1 with tropoelastin and fibrillin-1. *J Biol Chem* **276**, 39661-39666
48. Todorovic, V. und Rifkin, D. B. (2012) LTBP3s, more than just an escort service. *J Cell Biochem* **113**, 410-418

49. Colombatti, A., Spessotto, P., Doliana, R., Mongiat, M., Bressan, G. M. und Esposito, G. (2011) The EMILIN/Multimerin family. *Front Immunol* **2**, 93
50. Kielty, C. M., Sherratt, M. J. und Shuttleworth, C. A. (2002) Elastic fibres. *J Cell Sci* **115**, 2817-2828
51. Heinz, A., Jung, M. C., Duca, L., Sippl, W., Taddese, S., Ihling, C., Rusciani, A., Jahreis, G., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H. (2010) Degradation of tropoelastin by matrix metalloproteinases--cleavage site specificities and release of matrikines. *Febs J* **277**, 1939-1956
52. Kawagoe, M., Tsuruga, E., Oka, K., Sawa, Y. und Ishikawa, H. Matrix metalloproteinase-2 degrades fibrillin-1 and fibrillin-2 of oxytalan fibers in the human eye and periodontal ligaments in vitro. *Acta Histochem Cytochem* **46**, 153-159
53. Mecham, R. P., Broekelmann, T. J., Fliszar, C. J., Shapiro, S. D., Welgus, H. G. und Senior, R. M. (1997) Elastin degradation by matrix metalloproteinases. Cleavage site specificity and mechanisms of elastolysis. *J Biol Chem* **272**, 18071-18076
54. Cardoso, W. V., Sekhon, H. S., Hyde, D. M. und Thurlbeck, W. M. (1993) Collagen and Elastin in Human Pulmonary-Emphysema. *American Rev Respir Dis* **147**, 975-981
55. Carmo, M., Colombo, L., Bruno, A., Corsi, F. R. M., Roncoroni, L., Cuttin, M. S., Radice, F., Mussini, E. und Settembrini, P. G. (2002) Alteration of elastin, collagen and their cross-links in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc* **23**, 543-549
56. Duca, L., Floquet, N., Alix, A. J., Haye, B. und Debelle, L. (2004) Elastin as a matrikine. *Crit Rev Oncol Hematol* **49**, 235-244
57. Devy, J., Duca, L., Cantarelli, B., Joseph-Pietras, D., Scandolera, A., Rusciani, A., Parent, L., Thevenard, J., Pasco, S. B., Tarpin, M., Martiny, L. und Debelle, L. (2010) Elastin-derived peptides enhance melanoma growth in vivo by upregulating the activation of Mcol-A (MMP-1) collagenase. *Brit J Cancer* **103**, 1562-1570
58. Senior, R. M., Griffin, G. L. und Mecham, R. P. (1980) Chemotactic Activity of Elastin-Derived Peptides. *J Clin Invest* **66**, 859-862
59. Bashir, M. M., Indik, Z., Yeh, H., Ornsteingoldstein, N., Rosenbloom, J. C., Abrams, W., Fazio, M., Uitto, J. und Rosenbloom, J. (1989) Characterization of the Complete Human Elastin Gene - Delineation of Unusual Features in the 5'-Flanking Region. *J Biol Chem* **264**, 8887-8891
60. Szabo, Z., Levi-Minzi, S. A., Christiano, A. M., Struminger, C., Stoneking, M., Batzer, M. A. und Boyd, C. D. (1999) Sequential loss of two neighboring exons of the tropoelastin gene during primate evolution. *J Mol Evol* **49**, 664-671
61. Indik, Z., Yeh, H., Ornstein-Goldstein, N., Sheppard, P., Anderson, N., Rosenbloom, J. C., Peltonen, L. und Rosenbloom, J. (1987) Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 5680-5684

62. Indik, Z., Yoon, K., Morrow, S. D., Cicila, G., Rosenbloom, J. und Ornstein-Goldstein, N. (1987) Structure of the 3' region of the human elastin gene: great abundance of Alu repetitive sequences and few coding sequences. *Connect Tissue Res* **16**, 197-211
63. Taylor, J. S., Van de Peer, Y., Braasch, I. und Meyer, A. (2001) Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish. *Philos T R Soc B* **356**, 1661-1679
64. Keeley, F. W. (2013) The Evolution of Elastin. in *Evolution of Extracellular Matrix* (Keeley, F. W. und Mecham, R. P. eds.), Springer-Verlag Berlin-Heidelberg.
65. Heim, R. A., Pierce, R. A., Deak, S. B., Riley, D. J., Boyd, C. D. und Stolle, C. A. (1991) Alternative splicing of rat tropoelastin mRNA is tissue-specific and developmentally regulated. *Matrix* **11**, 359-366
66. Chung, M. I., Miao, M., Stahl, R. J., Chan, E., Parkinson, J. und Keeley, F. W. (2006) Sequences and domain structures of mammalian, avian, amphibian and teleost tropoelastins: Clues to the evolutionary history of elastins. *Matrix Biol* **25**, 492-504
67. Blanchevoye, C., Floquet, N., Scandolera, A., Baud, S., Maurice, P., Bocquet, O., Blaise, S., Ghoneim, C., Cantarelli, B., Delacoux, F., Dauchez, M., Efremov, R. G., Martiny, L., Duca, L. und Debelle, L. (2013) Interaction between the Elastin Peptide VGVAPG and Human Elastin Binding Protein. *J Biol Chem* **288**, 1317-1328
68. Debelle, L. und Tamburro, A. M. (1999) Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 261-272
69. Brown, P. L., Mecham, L., Tisdale, C. und Mecham, R. P. (1992) The cysteine residues in the carboxy terminal domain of tropoelastin form an intrachain disulfide bond that stabilizes a loop structure and positively charged pocket. *Biochem Biophys Res Commun* **186**, 549-555
70. Akhtar, K., Broekelmann, T. J., Song, H., Turk, J., Brett, T. J., Mecham, R. P. und Adair-Kirk, T. L. (2011) Oxidative modifications of the C-terminal domain of tropoelastin prevent cell binding. *J Biol Chem* **286**, 13574-13582
71. Kozel, B. A., Wachi, H., Davis, E. C. und Mecham, R. P. (2003) Domains in tropoelastin that mediate elastin deposition in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **278**, 18491-18498
72. Bax, D. V., Rodgers, U. R., Bilek, M. M. und Weiss, A. S. (2009) Cell adhesion to tropoelastin is mediated via the C-terminal GRKRR motif and integrin alphaVbeta3. *J Biol Chem* **284**, 28616-28623
73. Rodgers, U. R. und Weiss, A. S. (2004) Integrin alpha v beta 3 binds a unique non-RGD site near the C-terminus of human tropoelastin. *Biochimie* **86**, 173-178
74. Vrhovski, B., Jensen, S. und Weiss, A. S. (1997) Coacervation characteristics of recombinant human tropoelastin. *Eur J Biochem* **250**, 92-98

75. Yeo, G. C., Keeley, F. W. und Weiss, A. S. (2011) Coacervation of tropoelastin. *Adv Colloid Interface Sci* **167**, 94-103
76. Maeda, I., Fukumoto, Y., Nose, T., Shimohigashi, Y., Nezu, T., Terada, Y., Kodama, H., Kaibara, K. und Okamoto, K. (2011) Structural requirements essential for elastin coacervation: favorable spatial arrangements of valine ridges on the three-dimensional structure of elastin-derived polypeptide (VPGVG)<sub>n</sub>. *J Pept Sci* **17**, 735-743
77. Wise, S. G., Mithieux, S. M., Raftery, M. J. und Weiss, A. S. (2005) Specificity in the coacervation of tropoelastin: solvent exposed lysines. *J Struct Biol* **149**, 273-281
78. Uchida, K. (2000) Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radical Bio Med* **28**, 1685-1696
79. Rucker, R. B. und Murray, J. (1978) Cross-linking amino acids in collagen and elastin. *Am J Clin Nutr* **31**, 1221-1236
80. Eyre, D. (1987) Collagen cross-linking amino acids. *Methods Enzymol* **144**, 115-139
81. Anwar, R. A. und Oda, G. (1966) Structure of desmosine and isodesmosine. *Nature* **210**, 1254-1255
82. Viglio, S., Annovazzi, L., Luisetti, M., Stolk, J., Casado, B. und Iadarola, P. (2007) Progress in the methodological strategies for the detection in real samples of desmosine and isodesmosine, two biological markers of elastin degradation. *J Sep Sci* **30**, 202-213
83. Viglio, S., Stolk, J., Luisetti, M., Ferrari, F., Piccinini, P. und Iadarola, P. (2014) From micellar electrokinetic chromatography to liquid chromatography-mass spectrometry: Revisiting the way of analyzing human fluids for the search of desmosines, putative biomarkers of chronic obstructive pulmonary disease. *Electrophoresis* **35**, 109-118
84. Paz, M. A., Henson, E., Blumenfeld, S. und Gallop, P. M. (1971) Dehydromerodesmosine and Merodesmosine in Elastin. *Biochem Biophys Res Commun* **44**, 1518-1523
85. Akagawa, M., Yamazaki, K. und Suyama, K. (1999) Cyclopentenosine, major trifunctional crosslinking amino acid isolated from acid hydrolysate of elastin. *Arch Biochem Biophys* **372**, 112-120
86. Nakamura, F. und Suyama, K. (1991) Isolation and Structural Identification of a New Cross-Linking Amino-Acid, Allodesmosine, from the Acid Hydrolysate of Elastin. *Agr Biol Chem Tokyo* **55**, 547-554
87. Petruska, J. A. und Sandberg, L. B. (1968) The amino acid composition of elastin in its soluble and insoluble state. *Biochem Biophys Res Commun* **33**, 222-228
88. Dorrington, K. L. und McCrum, N. G. (1977) Elastin as a Rubber. *Biopolymers* **16**, 1201-1222
89. Chalmers, G. W., Gosline, J. M. und Lillie, M. A. (1999) The hydrophobicity of vertebrate elastins. *J Exp Biol* **202**, 301-314



90. Gosline, J., Lillie, M., Carrington, E., Guerette, P., Ortlepp, C. und Savage, K. (2002) Elastic proteins: biological roles and mechanical properties. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**, 121-132
91. Partridge, S. M. (1962) Elastin. *Adv Prot Chem* **17**, 227-302
92. Urry, D. W. (1988) Entropic elastic processes in protein mechanisms. I. Elastic structure due to an inverse temperature transition and elasticity due to internal chain dynamics. *J Protein Chem* **7**, 1-34
93. Hoeve, C. A. J. und Flory, P. J. (1958) The Elastic Properties of Elastin. *J Am Chem Soc* **80**, 6523-6526
94. Tamburro, A. M., Bochicchio, B. und Pepe, A. (2005) The dissection of human tropoelastin: from the molecular structure to the self-assembly to the elasticity mechanism. *Pathol Biol* **53**, 383-389
95. Rietschel, B., Arrey, T. N., Meyer, B., Bornemann, S., Schuerken, M., Karas, M. und Poetsch, A. (2009) Elastase digests: new ammunition for shotgun membrane proteomics. *Mol Cell Proteomics* **8**, 1029-1043
96. Werb, Z., Banda, M. J., McKerrow, J. H. und Sandhaus, R. A. (1982) Elastases and elastin degradation. *J Invest Dermatol* **79 Suppl 1**, 154s-159s
97. Boudier, C., Godeau, G., Hornebeck, W., Robert, L. und Bieth, J. G. (1991) The elastolytic activity of cathepsin G: an ex vivo study with dermal elastin. *Am J Respir Cell Mol Biol* **4**, 497-503
98. Schmelzer, C. E. H., Jung, M. C., Wohlrab, J., Neubert, R. H. H. und Heinz, A. (2012) Does human leukocyte elastase degrade intact skin elastin? *FEBS J* **279**, 4191-4200
99. Novinec, M., Grass, R. N., Stark, W. J., Turk, V., Baici, A. und Lenarcic, B. (2007) Interaction between human cathepsins K, L, and S and elastins - Mechanism of elastinolysis and inhibition by macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* **282**, 7893-7902
100. Bochicchio, B., Laurita, A., Heinz, A., Schmelzer, C. E. H. und Pepe, A. (2013) Investigating the Role of (2S,4R)-4-Hydroxyproline in Elastin Model Peptides. *Biomacromolecules* **14**, 4278-4288
101. Mithieux, S. M. und Weiss, A. S. (2005) Elastin. *Adv Protein Chem* **70**, 437-461
102. Mithieux, S. M., Wise, S. G. und Weiss, A. S. (2012) Tropoelastin - A multifaceted naturally smart material. *Adv Drug Deliv Rev* **65**, 421-428
103. Yeo, G. C., Baldock, C., Tuukkanen, A., Roessle, M., Dyksterhuis, L. B., Wise, S. G., Matthews, J., Mithieux, S. M. und Weiss, A. S. (2012) Tropoelastin bridge region positions the cell-interactive C terminus and contributes to elastic fiber assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 2878-2883

104. Lee, P., Bax, D. V., Bilek, M. M. und Weiss, A. S. (2013) A novel cell adhesion region in tropoelastin that mediates attachment to integrin alphaVbeta5. *J Biol Chem* **289**, 1467-1477
105. Wise, S. G., Yeo, G. C., Hiob, M. A., Rnjak-Kovacina, J., Kaplan, D. L., Ng, M. K. und Weiss, A. S. (2013) Tropoelastin: A versatile, bioactive assembly module. *Acta Biomaterials* **10**, 1532-1541
106. Muiznieks, L. D., Cirulis, J. T., van der Horst, A., Reinhardt, D. P., Wuite, G. J., Pomes, R. und Keeley, F. W. (2014) Modulated growth, stability and interactions of liquid-like coacervate assemblies of elastin. *Matrix Biol* **36**, 39-50
107. Reichheld, S. E., Muiznieks, L. D., Stahl, R., Simonetti, K., Sharpe, S. und Keeley, F. W. (2014) Conformational Transitions of the Crosslinking Domains of Elastin During Self-assembly. *J Biol Chem* **289**, 10057-10068
108. Yeo, G. C., Baldock, C., Wise, S. G. und Weiss, A. S. (2014) A Negatively-Charged Residue Stabilizes the Tropoelastin N-terminal Region for Elastic Fiber Assembly. *J Biol Chem* **289**, 34815-34826
109. Baldock, C., Oberhauser, A. F., Ma, L., Lammie, D., Siegler, V., Mithieux, S. M., Tu, Y., Chow, J. Y., Suleman, F., Malfois, M., Rogers, S., Guo, L., Irving, T. C., Wess, T. J. und Weiss, A. S. (2011) Shape of tropoelastin, the highly extensible protein that controls human tissue elasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 4322-4327
110. Brown-Augsburger, P., Tisdale, C., Broekelmann, T., Sloan, C. und Mecham, R. P. (1995) Identification of an elastin cross-linking domain that joins three peptide chains. Possible role in nucleated assembly. *J Biol Chem* **270**, 17778-17783
111. Kumashiro, K. K., Ohgo, K., Elliott, D. W., Kagawa, T. F. und Niemczura, W. P. (2012) Backbone motion in elastin's hydrophobic domains as detected by (2) H NMR spectroscopy. *Biopolymers* **97**, 882-888
112. de Hoffmann, E. (2001) Mass Spectrometry. in *Encyclopedia of Chemical Technology*, Wiley
113. Glish, G. L. und Vachet, R. W. (2003) The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 140-150
114. Takats, Z., Cotte-Rodriguez, I., Talaty, N., Chen, H. W. und Cooks, R. G. (2005) Direct, trace level detection of explosives on ambient surfaces by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Chem Commun* **15**, 1950-1952
115. Han, X. L. und Gross, R. W. (2003) Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *J Lipid Res* **44**, 1071-1079
116. Giessing, A. M. und Kirpekar, F. (2012) Mass spectrometry in the biology of RNA and its modifications. *Journal of proteomics* **75**, 3434-3449
117. Tost, J. und Gut, I. G. (2006) DNA analysis by mass spectrometry-past, present and future. *J Mass Spectrom* **41**, 981-995

118. van den Heuvel, R. H. und Heck, A. J. R. (2004) Native protein mass spectrometry: from intact oligomers to functional machineries. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 519-526
119. Aebersold, R. und Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198-207
120. Dettmer, K., Aronov, P. A. und Hammock, B. D. (2007) Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev* **26**, 51-78
121. Cooks, R. G., Ouyang, Z., Takats, Z. und Wiseman, J. M. (2006) Ambient mass spectrometry. *Science* **311**, 1566-1570
122. Harrison, A. G. und Onuska, F. I. (1978) Fragmentation in Chemical Ionization Mass-Spectrometry and Proton Affinity of Departing Neutral. *Org Mass Spectrom* **13**, 35-38
123. Spitzer, V. (1996) Structure analysis of fatty acids by gas chromatography--low resolution electron impact mass spectrometry of their 4,4-dimethyloxazoline derivatives--a review. *Prog Lipid Res* **35**, 387-408
124. Beckey, H. D. (2013) *Principles of Field Ionization and Field Desorption Mass Spectrometry. in International Series of Monographs on Analytical Chemistry.* Springer
125. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. und Whitehouse, C. M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71
126. Wilm, M. S. und Mann, M. (1994) Electrospray and Taylor-Cone Theory, Doles Beam of Macromolecules at Last. *Int J Mass Spectrom* **136**, 167-180
127. Hillenkamp, F. und Karas, M. (1990) Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol* **193**, 280-295
128. O'Donoghue, N. (2005) Introduction to protein and peptide analysis with mass spectrometry. *Proteomics* **5**, 4306-4306
129. Budzikiewicz, H. und Schäfer, M. (2012) *Massenspektrometrie: Eine Einführung,* Wiley
130. Cooks, R. G. und Rockwood, A. L. (1991) The Thomson - a Suggested Unit for Mass Spectroscopists. *Rapid Commun Mass Sp* **5**, 93-93
131. Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M. und Graham Cooks, R. (2005) The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom* **40**, 430-443
132. Makarov, A. (2000) Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem* **72**, 1156-1162
133. Karas, M. und Hillenkamp, F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **60**, 2299-2301

134. Beavis, R. C., Chaudhary, T. und Chait, B. T. (1992) Alpha-Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid as a Matrix for Matrix-Assisted Laser Desorption Mass-Spectrometry. *Org Mass Spectrom* **27**, 156-158
135. Beavis, R. C. und Chait, B. T. (1989) Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* **3**, 432-435
136. Jurinke, C., Oeth, P. und van den Boom, D. (2004) MALDI-TOF mass spectrometry - A versatile tool for high-performance DNA analysis. *Mol Biotechnol* **26**, 147-163
137. Marvin, L. F., Roberts, M. A. und Fay, L. B. (2003) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin Chim Acta* **337**, 11-21
138. Chang, W. C., Huang, L. C., Wang, Y. S., Peng, W. P., Chang, H. C., Hsu, N. Y., Yang, W. B. und Chen, C. H. (2007) Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mechanism revisited. *Anal Chim Acta* **582**, 1-9
139. Lu, I. C., Lee, C., Lee, Y. T. und Ni, C. K. (2015) Ionization Mechanism of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization. *Annu Rev Anal Chem* **8**, 21-39
140. Katta, V., Chow, D. T. und Rohde, M. F. (1998) Applications of in-source fragmentation of protein ions for direct sequence analysis by delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* **70**, 4410-4416
141. Guilhaus, M. (1995) Principles and Instrumentation in Time-of-Flight Mass-Spectrometry - Physical and Instrumental Concepts. *J Mass Spectrom* **30**, 1519-1532
142. Chen, H. S., Rejtar, T., Andreev, V., Moskovets, E. und Karger, B. L. (2005) Enhanced characterization of complex proteomic samples using LC-MALDI MS/MS: Exclusion of redundant peptides from MS/MS analysis in replicate runs. *Anal Chem* **77**, 7816-7825
143. Medzihradzky, K. F., Campbell, J. M., Baldwin, M. A., Falick, A. M., Juhasz, P., Vestal, M. L. und Burlingame, A. L. (2000) The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Anal Chem* **72**, 552-558
144. Macht, M., Asperger, A. und Deininger, S. O. (2004) Comparison of laser-induced dissociation and high-energy collision-induced dissociation using matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) for peptide and protein identification. *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**, 2093-2105
145. Iavarone, A. T., Jurchen, J. C. und Williams, E. R. (2000) Effects of solvent on the maximum charge state and charge state distribution of protein ions produced by electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectr* **11**, 976-985
146. Taflin, D. C., Ward, T. L. und Davis, E. J. (1989) Electrified Droplet Fission and the Rayleigh Limit. *Langmuir* **5**, 376-384

147. Sterling, H. J. und Williams, E. R. (2009) Origin of Supercharging in Electrospray Ionization of Noncovalent Complexes from Aqueous Solution. *J Am Soc Mass Spectr* **20**, 1933-1943
148. Yates, J. R., Ruse, C. I. und Nakorchevsky, A. (2009) Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Engin* **11**, 49-79
149. Nagele, E., Vollmer, M., Horth, P. und Vad, C. (2004) 2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures. *Expert Rev Proteomics* **1**, 37-46
150. Paul, W., Reinhard, H. P. und Vonzahn, U. (1958) Das Elektrische Massenfilter Als Massenspektrometer Und Isotopentrenner. *Z Phys* **152**, 143-182
151. Douglas, D. J. (2009) Linear quadrupoles in mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* **28**, 937-960
152. Mathieu, E. (1868) Mémoire sur Le Mouvement Vibratoire d'une Membrane de forme Elliptique. *Journal de Mathématiques Pures et Appliquées*, 137-203
153. Chernushevich, I. V., Loboda, A. V. und Thomson, B. A. (2001) An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **36**, 849-865
154. Analyzer,(2015)  
[http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical\\_Chemistry/Instrumental\\_Analysis/Mass\\_Spectrometry/Mass\\_Spectrometers\\_\(Instrumentation\)/Mass\\_Analyzers\\_\(Mass\\_Spectrometry\)](http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Mass_Spectrometry/Mass_Spectrometers_(Instrumentation)/Mass_Analyzers_(Mass_Spectrometry)).
155. Harrison, A. G. (1999) Energy-resolved mass spectrometry: a comparison of quadrupole cell and cone-voltage collision-induced dissociation. *Rapid Commun Mass Spectrom* **13**, 1663-1670
156. Kingdon, K. H. (1923) A Method for the Neutralization of Electron Space Charge by Positive Ionization at Very Low Gas Pressures. *Phys. Rev.* **21**, 408
157. Knight, R. D. (1981) Storage of Ions from Laser-Produced Plasmas. *Appl Phys Lett* **38**, 221-223
158. Hu, Q. Z., Noll, R. J., Li, H. Y., Makarov, A., Hardman, M. und Cooks, R. G. (2005) The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom* **40**, 430-443
159. Lu, W. Y., Clasquin, M. F., Melamud, E., Amador-Noguez, D., Caudy, A. A. und Rabinowitz, J. D. (2010) Metabolomic Analysis via Reversed-Phase Ion-Pairing Liquid Chromatography Coupled to a Stand Alone Orbitrap Mass Spectrometer. *Anal Chem* **82**, 3212-3221
160. Gallien, S., Duriez, E., Crone, C., Kellmann, M., Moehring, T. und Domon, B. (2012) Targeted Proteomic Quantification on Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer. *Mol Cell Proteomics* **11**, 1709-1723
161. Olsen, J. V., Schwartz, J. C., Griep-Raming, J., Nielsen, M. L., Damoc, E., Denisov, E., Lange, O., Remes, P., Taylor, D., Splendore, M., Wouters, E. R., Senko, M.,

- Makarov, A., Mann, M. und Horning, S. (2009) A Dual Pressure Linear Ion Trap Orbitrap Instrument with Very High Sequencing Speed. *Mol Cell Proteomics* **8**, 2759-2769
162. Senko, M. W., Remes, P. M., Canterbury, J. D., Mathur, R., Song, Q. Y., Eliuk, S. M., Mullen, C., Earley, L., Hardman, M., Blethrow, J. D., Bui, H., Specht, A., Lange, O., Denisov, E., Makarov, A., Horning, S. und Zabrouskov, V. (2013) Novel Parallelized Quadrupole/Linear Ion Trap/Orbitrap Tribrid Mass Spectrometer Improving Proteome Coverage and Peptide Identification Rates. *Anal Chem* **85**, 11710-11714
163. Makarov, A., Denisov, E. und Lange, O. (2009) Performance Evaluation of a High-field Orbitrap Mass Analyzer. *J Am Soc Mass Spectrom* **20**, 1391-1396
164. Baldwin, M. A. (2004) Protein identification by mass spectrometry - Issues to be considered. *Mol Cell Proteomics* **3**, 1-9
165. Carion, M., Wattiez, R. und Falmagne, P. (1996) Protein microsequencing by automated EDMAN degradation. Cysteine identification after alkylation with acrylamide in the microsequencer reaction cartridge. *Arch Physiol Biochem* **104**, B34-B34
166. Edman, P. (1950) Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides. *Acta Chem Scand* **4**, 283-293
167. Edman, P. und Begg, G. (1967) A protein sequenator. *Eur J Biochem* **1**, 80-91
168. Chait, B. T. (2006) Mass spectrometry: Bottom-up or top-down? *Science* **314**, 65-66
169. Hancock, W. S., Bishop, C. A., Prestidge, R. L., Harding, D. R. K. und Hearn, M. T. W. (1978) Reversed-Phase, High-Pressure Liquid-Chromatography of Peptides and Proteins with Ion-Pairing Reagents. *Science* **200**, 1168-1170
170. Geromanos, S. J., Vissers, J. P., Silva, J. C., Dorschel, C. A., Li, G. Z., Gorenstein, M. V., Bateman, R. H. und Langridge, J. I. (2009) The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics* **9**, 1683-1695
171. Michalski, A., Cox, J. und Mann, M. (2011) More than 100,000 Detectable Peptide Species Elute in Single Shotgun Proteomics Runs but the Majority is Inaccessible to Data-Dependent LC-MS/MS. *J Proteome Res* **10**, 1785-1793
172. Zubarev, R. A., Kelleher, N. L. und McLafferty, F. W. (1998) Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. A nonergodic process. *J Am Chem Soc* **120**, 3265-3266
173. Kim, M. S. und Pandey, A. (2012) Electron transfer dissociation mass spectrometry in proteomics. *Proteomics* **12**, 530-542
174. Syka, J. E., Coon, J. J., Schroeder, M. J., Shabanowitz, J. und Hunt, D. F. (2004) Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9528-9533

175. Roepstorff, P. und Fohlman, J. (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* **11**, 601
176. Lermyte, F., Konijnenberg, A., Williams, J. P., Brown, J. M., Valkenburg, D. und Sobott, F. (2014) ETD Allows for Native Surface Mapping of a 150 kDa Noncovalent Complex on a Commercial Q-TWIMS-TOF Instrument. *J Am Soc Mass Spectr* **25**, 343-350
177. Frese, C. K., Altelaar, A. F. M., Hennrich, M. L., Nolting, D., Zeller, M., Griep-Raming, J., Heck, A. J. R. und Mohammed, S. (2011) Improved Peptide Identification by Targeted Fragmentation Using CID, HCD and ETD on an LTQ-Orbitrap Velos. *J Proteome Res* **10**, 2377-2388
178. Olsen, J. V., Macek, B., Lange, O., Makarov, A., Horning, S. und Mann, M. (2007) Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat Methods* **4**, 709-712
179. Harrison, A. G. (2009) To b or not to b: the ongoing saga of peptide b ions. *Mass Spectrom Rev* **28**, 640-654
180. Papayannopoulos, I. A. (1995) The Interpretation of Collision-Induced Dissociation Tandem Mass-Spectra of Peptides. *Mass Spectrom Rev* **14**, 49-73
181. Addona, T. und Clauser, K. (2002) De novo peptide sequencing via manual interpretation of MS/MS spectra. *Curr Protoc Protein Sci* **16**, 11
182. Seidler, J., Zinn, N., Boehm, M. E. und Lehmann, W. D. (2010) De novo sequencing of peptides by MS/MS. *Proteomics* **10**, 634-649
183. Spengler, B. (2004) De novo sequencing, peptide composition analysis, and composition-based sequencing: a new strategy employing accurate mass determination by fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **15**, 703-714
184. Kinter, M. und Sherman, N. E. (2000) *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*, Wiley & Sons, Inc.
185. Marcotte, E. M. (2007) How do shotgun proteomics algorithms identify proteins? *Nat Biotechnol* **25**, 755-757
186. Kall, L., Storey, J. D., MacCoss, M. J. und Noble, W. S. (2008) Assigning significance to peptides identified by tandem mass spectrometry using decoy databases. *J Proteome Res* **7**, 29-34
187. Elias, J. E. und Gygi, S. P. (2007) Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods* **4**, 207-214
188. O'Farrell, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**, 4007-4021
189. Fields, S. (2001) Proteomics - Proteomics in genomeland. *Science* **291**, 1221-1224

190. Hebert, A. S., Richards, A. L., Bailey, D. J., Ulbrich, A., Coughlin, E. E., Westphall, M. S. und Coon, J. J. (2014) The one hour yeast proteome. *Mol Cell Proteomics* **13**, 339-347
191. Michalski, A., Damoc, E., Lange, O., Denisov, E., Nolting, D., Muller, M., Viner, R., Schwartz, J., Remes, P., Belford, M., Dunyach, J. J., Cox, J., Horning, S., Mann, M. und Makarov, A. (2012) Ultra high resolution linear ion trap Orbitrap mass spectrometer (Orbitrap Elite) facilitates top down LC MS/MS and versatile peptide fragmentation modes. *Mol Cell Proteomics* **11**, O111 013698
192. Wilhelm, M., Schlegl, J., Hahne, H., Moghaddas Gholami, A., Lieberenz, M., Savitski, M. M., Ziegler, E., Butzmann, L., Gessulat, S., Marx, H., Mathieson, T., Lemeer, S., Schnatbaum, K., Reimer, U., Wenschuh, H., Mollenhauer, M., Slotta-Huspenina, J., Boese, J. H., Bantscheff, M., Gerstmair, A., Faerber, F. und Kuster, B. (2014) Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature* **509**, 582-587
193. Feng, L. J., Lin, T. X., Uranishi, H., Gu, W. und Xu, Y. (2005) Functional analysis of the roles of posttranslational modifications at the p53 C terminus in regulating p53 stability and activity. *Mol Cell Biol* **25**, 5389-5395
194. Krishna, R. G. und Wold, F. (1993) Post-Translational Modifications of Proteins. in *Methods in Protein Sequence Analysis* (Imahori, K. und Sakiyama, F. eds.). 167-172
195. Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S. und Gatto, G. J. (2005) Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Edit* **44**, 7342-7372
196. Seo, J. und Lee, K. J. (2004) Post-translational modifications and their biological functions: Proteomic analysis and systematic approaches. *J Biochem Mol Biol* **37**, 35-44
197. Sechi, S. und Chait, B. T. (1998) Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. *Anal Chem* **70**, 5150-5158
198. Yang, H. und Zubarev, R. A. (2010) Mass spectrometric analysis of asparagine deamidation and aspartate isomerization in polypeptides. *Electrophoresis* **31**, 1764-1772
199. Mann, M. und Jensen, O. N. (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* **21**, 255-261
200. Han, X., He, L., Xin, L., Shan, B. Z. und Ma, B. (2011) PeaksPTM: Mass Spectrometry-Based Identification of Peptides with Unspecified Modifications. *J Proteome Res* **10**, 2930-2936
201. Tanner, S., Shu, H. J., Frank, A., Wang, L. C., Zandi, E., Mumby, M., Pevzner, P. A. und Bafna, V. (2005) InsPecT: Identification of posttranslational modified peptides from tandem mass spectra. *Anal Chem* **77**, 4626-4639



202. Han, Y., Ma, B. und Zhang, K. (2005) SPIDER: software for protein identification from sequence tags with de novo sequencing error. *J Bioinform Comput Biol* **3**, 697-716
203. Zhang, J., Xin, L., Shan, B., Chen, W., Xie, M., Yuen, D., Zhang, W., Zhang, Z., Lajoie, G. A. und Ma, B. (2012) PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. *Mol Cell Proteomics* **11**, M111010587
204. Molina, H., Horn, D. M., Tang, N., Mathivanan, S. und Pandey, A. (2007) Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 2199-2204
205. Creighton, T. E. (1997) Protein folding coupled to disulphide bond formation. *Biol Chem* **378**, 731-744
206. Larios, J. M., Budhiraja, R., Fanburg, B. L. und Thannickal, V. J. (2001) Oxidative protein cross-linking reactions involving L-tyrosine in transforming growth factor-beta 1-stimulated fibroblasts. *J Biol Chem* **276**, 17437-17441
207. Pinnell, S. R. und Martin, G. R. (1968) The cross-linking of collagen and elastin: enzymatic conversion of lysine in peptide linkage to alpha-amino adipic-delta-semialdehyde (allysine) by an extract from bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **61**, 708-716
208. Sinz, A. (2006) Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions. *Mass Spectrom Rev* **25**, 663-682
209. Du, X., Chowdhury, S. M., Manes, N. P., Wu, S., Mayer, M. U., Adkins, J. N., Anderson, G. A. und Smith, R. D. (2011) Xlink-identifier: an automated data analysis platform for confident identifications of chemically cross-linked peptides using tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* **10**, 923-931
210. Rinner, O., Seebacher, J., Walzthoeni, T., Mueller, L. N., Beck, M., Schmidt, A., Mueller, M. und Aebersold, R. (2008) Identification of cross-linked peptides from large sequence databases. *Nat Methods* **5**, 315-318
211. Yang, B., Wu, Y. J., Zhu, M., Fan, S. B., Lin, J., Zhang, K., Li, S., Chi, H., Li, Y. X., Chen, H. F., Luo, S. K., Ding, Y. H., Wang, L. H., Hao, Z., Xiu, L. Y., Chen, S., Ye, K., He, S. M. und Dong, M. Q. (2012) Identification of cross-linked peptides from complex samples. *Nat Methods* **9**, 904-906
212. Götze, M., Pettelkau, J., Schaks, S., Bosse, K., Ihling, C. H., Krauth, F., Fritzsche, R., Kuhn, U. und Sinz, A. (2012) StavroX--a software for analyzing crosslinked products in protein interaction studies. *J Am Soc Mass Spectrom* **23**, 76-87
213. Lössl, P., Kolbel, K., Tanzler, D., Nannemann, D., Ihling, C. H., Keller, M. V., Schneider, M., Zaucke, F., Meiler, J. und Sinz, A. (2014) Analysis of nidogen-1/laminin gamma1 interaction by cross-linking, mass spectrometry, and computational modeling reveals multiple binding modes. *PLOS one* **9**, e112886

214. Young, M. M., Tang, N., Hempel, J. C., Oshiro, C. M., Taylor, E. W., Kuntz, I. D., Gibson, B. W. und Dollinger, G. (2000) High throughput protein fold identification by using experimental constraints derived from intramolecular cross-links and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 5802-5806
215. Sinz, A. (2003) Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes. *J Mass Spectrom* **38**, 1225-1237
216. Müller, D. R., Schindler, P., Towbin, H., Wirth, U., Voshol, H., Hoving, S. und Steinmetz, M. O. (2001) Isotope tagged cross linking reagents. A new tool in mass spectrometric protein interaction analysis. *Anal Chem* **73**, 1927-1934
217. Müller, M. Q., Dreiocker, F., Ihling, C. H., Schäfer, M. und Sinz, A. (2010) Cleavable Cross-Linker for Protein Structure Analysis: Reliable Identification of Cross-Linking Products by Tandem MS. *Anal Chem* **82**, 6958-6968
218. Sinz, A. (2014) The advancement of chemical cross-linking and mass spectrometry for structural proteomics: from single proteins to protein interaction networks. *Expert Rev Proteomics* **11**, 733-743
219. Olsen, J. V., Ong, S. E. und Mann, M. (2004) Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol Cell Proteomics* **3**, 608-614
220. Fritzsche, R., Ihling, C. H., Götze, M. und Sinz, A. (2012) Optimizing the enrichment of cross-linked products for mass spectrometric protein analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* **26**, 653-658
221. Leitner, A., Walzthoeni, T., Kahraman, A., Herzog, F., Rinner, O., Beck, M. und Aebersold, R. (2010) Probing Native Protein Structures by Chemical Cross-linking, Mass Spectrometry, and Bioinformatics. *Mol Cell Proteomics* **9**, 1634-1649
222. Schilling, B., Row, R. H., Gibson, B. W., Guo, X. und Young, M. M. (2003) MS2Assign, automated assignment and nomenclature of tandem mass spectra of chemically crosslinked peptides. *J Am Soc Mass Spectrom* **14**, 834-850
223. Heinz, A., Ruttkies, C. K., Jahreis, G., Schröder, C. U., Wichapong, K., Sippl, W., Keeley, F. W., Neubert, R. H. und Schmelzer, C. E. H. (2013) In vitro cross-linking of elastin peptides and molecular characterization of the resultant biomaterials. *Biochim Biophys Acta* **1830**, 2994-3004
224. Rey, M., Yang, M., Burns, K. M., Yu, Y., Lees-Miller, S. P. und Schriemer, D. C. (2013) Nepenthesin from monkey cups for hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **12**, 464-472
225. Boutin, M., Berthelette, C., Gervais, F. G., Scholand, M. B., Hoidal, J., Leppert, M. F., Bateman, K. P. und Thibault, P. (2009) High-sensitivity nanoLC-MS/MS analysis of urinary desmosine and isodesmosine. *Anal Chem* **81**, 1881-1887

226. Uutela, P., Ketola, R. A., Piepponen, P. und Kostiaainen, R. (2009) Comparison of different amino acid derivatives and analysis of rat brain microdialysates by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* **633**, 223-231
227. Schröder, C. U., Heinz, A., Majovsky, P. und Schmelzer, C. E. H. (2015) Fingerprinting Desmosine-Containing Elastin Peptides. *J Am Soc Mass Spectrom* **26**, 762-773
228. McGrath, A. P., Mithieux, S. M., Collyer, C. A., Bakhuis, J. G., van den Berg, M., Sein, A., Heinz, A., Schmelzer, C. E. H., Weiss, A. S. und Guss, J. M. (2011) Structure and activity of *Aspergillus nidulans* copper amine oxidase. *Biochemistry* **50**, 5718-5730
229. Schröder, C. U. (2012) *Massenspektrometrische Identifizierung von Quervernetzungen in Elastin und quervernetzten Elastindomänen*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Masterarbeit
230. Rappsilber, J., Mann, M. und Ishihama, Y. (2007) Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc* **2**, 1896-1906
231. Miao, M., Stahl, R. J., Petersen, L. F., Reintsch, W. E., Davis, E. C. und Keeley, F. W. (2009) Characterization of an unusual tropoelastin with truncated C-terminus in the frog. *Matrix Biol* **28**, 432-441
232. Heinz, A., Schröder, C. U., Baud, S., Keeley, F. W., Mithieux, S. M., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H. (2014) Molecular-level characterization of elastin-like constructs and human aortic elastin. *Matrix Biol* **38**, 12-21
233. Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E. und Berendsen, H. J. (2005) GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem* **26**, 1701-1718
234. Jorgensen, W. L. und Tirado-Rives, J. (1988) The OPLS Force Field for Proteins. Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 1657-1666
235. Ryckaert, J. P., Ciccotti, G. und Berendsen, H. J. C. (1977) Numerical integration of the Cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J Comput Phys* **23**, 327-341
236. Case, D. A., Cheatham, T. E., 3rd, Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Jr., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B. und Woods, R. J. (2005) The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem* **26**, 1668-1688
237. Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W. und Taylor, R. D. (2003) Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins* **52**, 609-623
238. Keil, B. (1992) *Specificity of Proteolysis*, Springer-Verlag, New York
239. Shimada, W., Bowman, A., Davis, N. R. und Anwar, R. A. (1969) An approach to the study of the structure of desmosine and isodesmosine containing peptides isolated from the elastase digest of elastin. *Biochem Biophys Res Commun* **37**, 191-197

240. Davril, M. und Han, K. K. (1974) Isolation and characterization of a highly cross-linked peptide from elastin of porcine aorta. *FEBS Lett* **43**, 331-336
241. Gerber, G. E. und Anwar, R. A. (1974) Structural studies on cross-linked regions of elastin. *J Biol Chem* **249**, 5200-5207
242. Vrhovski, B. und Weiss, A. S. (1998) Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem* **258**, 1-18
243. Tugarinov, V., Zvi, A., Levy, R. und Anglister, J. (1999) A cis proline turn linking two beta-hairpin strands in the solution structure of an antibody-bound HIV-1(IIIB) V3 peptide. *Nat Struct Biol* **6**, 331-335
244. Pappin, D. J. C., Hojrup, P. und Bleasby, A. J. (1993) Rapid Identification of Proteins by Peptide-Mass Fingerprinting. *Curr Biol* **3**, 327-332
245. Falick, A. M., Hines, W. M., Medzihradzky, K. F., Baldwin, M. A. und Gibson, B. W. (1993) Low-Mass Ions Produced from Peptides by High-Energy Collision-Induced Dissociation in Tandem Mass-Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectr* **4**, 882-893
246. Franzblau, C., Faris, B. und Papaioannou, R. (1969) Lysinonorleucine. A new amino acid from hydrolysates of elastin. *Biochemistry* **8**, 2833-2837
247. Tamburro, A. M., Pepe, A. und Bochicchio, B. (2006) Localizing alpha-helices in human tropoelastin: assembly of the elastin "puzzle". *Biochemistry* **45**, 9518-9530
248. Bailey, A. J., Ranta, M. H., Nicholls, A. C., Partridge, S. M. und Elsdon, D. F. (1977) Isolation of Alpha-Amino Adipic Acid from Mature Dermal Collagen and Elastin - Evidence for an Oxidative Pathway in Maturation of Collagen and Elastin. *Biochem Bioph Res Co* **78**, 1403-1410
249. Keller, B. O., Suj, J., Young, A. B. und Whittal, R. M. (2008) Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Anal Chim Acta* **627**, 71-81
250. Getie, M., Schmelzer, C. E. H. und Neubert, R. H. H. (2005) Characterization of peptides resulting from digestion of human skin elastin with elastase. *Proteins* **61**, 649-657
251. Kadek, A., Mrazek, H., Halada, P., Rey, M., Schriemer, D. C. und Man, P. (2014) Aspartic protease nepenthesin-1 as a tool for digestion in hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Anal Chem* **86**, 4287-4294
252. Gass, J. und Khosla, C. (2007) Prolyl endopeptidases. *Cell Mol Life Sci* **64**, 345-355
253. Yang, M., Hoepfner, M., Rey, M., Kadek, A., Man, P. und Schriemer, D. C. (2015) Recombinant Nepenthesin II for Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Anal Chem* **87**, 6681-6687
254. Adam, J. H. (1997) Prey Spectra of Bornean Nepenthes Species (Nepenthaceae) in Relation to their Habitat. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* **20**, 121-134

255. Schmelzer, C. E. H., Getie, M. und Neubert, R. H. H. (2005) Mass spectrometric characterization of human skin elastin peptides produced by proteolytic digestion with pepsin and thermitase. *J Chromatogr A* **1083**, 120-126
256. Moriyama, A., Nakanishi, M. und Sasaki, M. (1988) Porcine muscle prolyl endopeptidase and its endogenous substrates. *J Biochem* **104**, 112-117
257. Fulop, V., Bocskei, Z. und Polgar, L. (1998) Prolyl oligopeptidase: An unusual beta-propeller domain regulates proteolysis. *Cell* **94**, 161-170
258. Couttas, T. A., Raftery, M. J., Bernardini, G. und Wilkins, M. R. (2008) Immonium ion scanning for the discovery of post-translational modifications and its application to histones. *J Proteome Res* **7**, 2632-2641
259. Müller, M. Q., Zeiser, J. J., Dreiocker, F., Pich, A., Schafer, M. und Sinz, A. (2011) A universal matrix-assisted laser desorption/ionization cleavable cross-linker for protein structure analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* **25**, 155-161
260. Yalcin, T. und Harrison, A. G. (1996) Ion chemistry of protonated lysine derivatives. *J Mass Spectrom* **31**, 1237-1243
261. Shek, P. Y., Zhao, J., Ke, Y., Siu, K. W. und Hopkinson, A. C. (2006) Fragmentations of protonated arginine, lysine and their methylated derivatives: concomitant losses of carbon monoxide or carbon dioxide and an amine. *J Phys Chem* **110**, 8282-8296
262. Dookeran, N. N., Yalcin, T. und Harrison, A. G. (1996) Fragmentation reactions of protonated alpha-amino acids. *J Mass Spectrom* **31**, 500-508
263. Milne, G. W. A., Axenrod, T. und Fales, H. M. (1970) Chemical Ionization Mass Spectrometry of Complex Molecules .4. Amino Acids. *J Am Chem Soc* **92**, 5170-&
264. Barry, S. J., Carr, R. M., Lane, S. J., Leavens, W. J., Monte, S. und Waterhouse, I. (2003) Derivatisation for liquid chromatography/electrospray mass spectrometry: synthesis of pyridinium compounds and their amine and carboxylic acid derivatives. *Rapid Commun Mass Sp* **17**, 603-620
265. Baker, A. G., Wiesler, D. und Novotny, M. V. (1999) Tandem mass spectrometry of model peptides modified with trans-2-hexenal, a product of lipid peroxidation. *J Am Soc Mass Spectrom* **10**, 613-624
266. Denekamp, C., Tenetov, E. und Horev, Y. (2003) Homolytic cleavages in pyridinium ions, an excited state process. *J Am Soc Mass Spectrom* **14**, 790-801
267. Katritzky, A. R., Watson, C. H., Degaszafran, Z. und Eyler, J. R. (1989) Collisionally Activated Dissociation of Some Pyridinium Cations - Novel Fragmentation Pathways. *Org Mass Spectrom* **24**, 1017-1021
268. Geiger, T., Cox, J. und Mann, M. (2010) Proteomics on an Orbitrap benchtop mass spectrometer using all-ion fragmentation. *Mol Cell Proteomics* **9**, 2252-2261
269. Kaga, N., Soma, S., Fujimura, T., Seyama, K., Fukuchi, Y. und Murayama, K. (2003) Quantification of elastin cross-linking amino acids, desmosine and isodesmosine, in

- hydrolysates of rat lung by ion-pair liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* **318**, 25-29
270. Muiznieks, L. D., Weiss, A. S. und Keeley, F. W. (2010) Structural disorder and dynamics of elastin. *Biochem Cell Biol* **88**, 239-250
271. Annesley, T. M. (2003) Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem* **49**, 1041-1044
272. Wang, J., Wang, Y. W. und Gu, J. K. (2004) Ion suppression in proteomics analysis with ESI and MALDI/Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **3**, S142-S142
273. Echan, L. A., Tang, H. Y., Ali-Khan, N., Lee, K. und Speicher, D. W. (2005) Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics* **5**, 3292-3303
274. Eyre, D. R., Weis, M. A. und Wu, J. J. (2008) Advances in collagen cross-link analysis. *Methods* **45**, 65-74
275. Ricardblum, S. und Ville, G. (1989) Collagen Cross-Linking. *Int J Biochem* **21**, 1185-1189
276. Terajima, M., Perdivara, I., Sricholpech, M., Deguchi, Y., Pleshko, N., Tomer, K. B. und Yamauchi, M. (2014) Glycosylation and Cross-linking in Bone Type I Collagen. *J Biol Chem* **289**, 22636-22647
277. Eyre, D. R., Weis, M. A. und Wu, J. J. (2010) Maturation of Collagen Ketoimine Cross-links by an Alternative Mechanism to Pyridinoline Formation in Cartilage. *J Biol Chem* **285**, 16675-16682
278. Song, E. W. und Mechref, Y. (2013) LC-MS/MS Identification of the O-Glycosylation and Hydroxylation of Amino Acid Residues of Collagen alpha-1 (II) chain from Bovine Cartilage. *J Proteome Res* **12**, 3599-3609
279. Perla-Kajan, J., Gryszczynska, A., Mielcarek, S. und Jakubowski, H. (2011) Cation exchange HPLC analysis of desmosines in elastin hydrolysates. *Anal Bioanal Chem* **401**, 2473-2479
280. Mecham, R. P. und Lange, G. (1982) Antibodies to Insoluble and Solubilized Elastin. *Method Enzymol* **82**, 744-759
281. Gao, D., McBean, N., Schultz, J. S., Yan, Y. S., Mulchandani, A. und Chen, W. F. (2006) Fabrication of antibody arrays using thermally responsive elastin fusion proteins. *J Am Chem Soc* **128**, 676-677
282. Grosso, L. E. und Scott, M. (1993) Peptide Sequences Selected by Ba4, a Tropoelastin-Specific Monoclonal-Antibody, Are Ligands for the 67-Kilodalton Bovine Elastin Receptor. *Biochemistry* **32**, 13369-13374
283. Sato, T., Kajikuri, T., Saito, Y., Chikuma, M. und Nagai, S. (2008) Determination of desmosine in bronchoalveolar lavage fluids by time-resolved fluoroimmunoassay. *Clin Chim Acta* **387**, 113-119

284. Wrenn, D. S., Griffin, G. L., Senior, R. M. und Mecham, R. P. (1986) Characterization of Biologically-Active Domains on Elastin - Identification of a Monoclonal-Antibody to a Cell Recognition Site. *Biochemistry* **25**, 5172-5176
285. Gill, S. C. und Vonhippel, P. H. (1989) Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino-Acid Sequence Data. *Anal Biochem* **182**, 319-326
286. Petrotchenko, E. V., Serpa, J. J. und Borchers, C. H. (2010) Use of a combination of isotopically coded cross-linkers and isotopically coded N-terminal modification reagents for selective identification of inter-peptide crosslinks. *Anal Chem* **82**, 817-823
287. Chen, X. H., Chen, Y. H. und Anderson, V. E. (1999) Protein cross-links: Universal isolation and characterization by isotopic derivatization and electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* **273**, 192-203
288. Choudhary, G., Wu, S. L., Shieh, P. und Hancock, W. S. (2003) Multiple enzymatic digestion for enhanced sequence coverage of proteins in complex proteomic mixtures using capillary LC with ion trap MS/MS. *J Proteome Res* **2**, 59-67
289. Swaney, D. L., Wenger, C. D. und Coon, J. J. (2010) Value of Using Multiple Proteases for Large-Scale Mass Spectrometry-Based Proteomics. *J Proteome Res* **9**, 1323-1329
290. Heinz, A., Jung, M. C., Jahreis, G., Rusciani, A., Duca, L., Debelle, L., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H. (2012) The action of neutrophil serine proteases on elastin and its precursor. *Biochimie* **94**, 192-202
291. Wysocki, V. H., Resing, K. A., Zhang, Q. und Cheng, G. (2005) Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods* **35**, 211-222
292. Wysocki, V. H., Tsaprailis, G., Smith, L. L. und Breci, L. A. (2000) Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *J Mass Spectrom* **35**, 1399-1406
293. Ongay, S., Hermans, J., Bruins, A. P., Nieuwendijk, A. M., Overkleeft, H. und Bischoff, R. (2012) Electron Transfer and Collision Induced Dissociation of Non-Derivatized and Derivatized Desmosine and Isodesmosine. *J Am Soc Mass Spectrom* **24**, 83-91
294. Luisetti, M., Ma, S., Iadarola, P., Stone, P. J., Viglio, S., Casado, B., Lin, Y. Y., Snider, G. L. und Turino, G. M. (2008) Desmosine as a biomarker of elastin degradation in COPD: current status and future directions. *Eur Respir J* **32**, 1146-1157
295. King, G. S., Mohan, V. S. und Starcher, B. C. (1980) Radioimmunoassay for desmosine. *Connect Tissue Res* **7**, 263-267
296. Liu, X., Ma, S., Liu, S., Liu, M., Turino, G. und Cantor, J. (2015) The Ratio of Free to Bound Desmosine and Isodesmosine May Reflect Emphysematous Changes in COPD. *Lung* **193**, 329-334

297. Ma, S., Lieberman, S., Turino, G. M. und Lin, Y. Y. (2003) The detection and quantitation of free desmosine and isodesmosine in human urine and their peptide-bound forms in sputum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12941-12943
298. Ma, S., Lin, Y. Y. und Turino, G. M. (2007) Measurements of desmosine and isodesmosine by mass spectrometry in COPD. *Chest* **131**, 1363-1371
299. Maleknia, S. D. und Johnson, R. (2012) Mass Spectrometry of Amino Acids and Proteins. in *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry* (Hughes, A. B. ed.), Wiley. 15
300. Yang, Y. H., Lee, K., Jang, K. S., Kim, Y. G., Park, S. H., Lee, C. S. und Kim, B. G. (2009) Low mass cutoff evasion with q(z) value optimization in ion trap. *Anal Biochem* **387**, 133-135
301. Zhang, M. Y., Pace, N., Kerns, E. H., Kleintop, T., Kagan, N. und Sakuma, T. (2005) Hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometry in fragmentation mechanism studies: application to structure elucidation of buspirone and one of its metabolites. *J Mass Spectrom* **40**, 1017-1029
302. Chi, H., Sun, R. X., Yang, B., Song, C. Q., Wang, L. H., Liu, C., Fu, Y., Yuan, Z. F., Wang, H. P., He, S. M. und Dong, M. Q. (2010) pNovo: De novo Peptide Sequencing and Identification Using HCD Spectra. *J Proteome Res* **9**, 2713-2724
303. Clark, D. F., Go, E. P., Toumi, M. L. und Desaire, H. (2011) Collision Induced Dissociation Products of Disulfide-Bonded Peptides: Ions Result from the Cleavage of More Than One Bond. *J Am Soc Mass Spectrom* **22**, 492-498
304. Grewal, R. N., El Aribi, H., Harrison, A. G., Siu, K. W. M. und Hopkinson, A. C. (2004) Fragmentation of protonated tripeptides: The proline effect revisited. *J Phys Chem B* **108**, 4899-4908
305. Dongre, A. R., Jones, J. L., Somogyi, A. und Wysocki, V. H. (1996) Influence of peptide composition, gas-phase basicity, and chemical modification on fragmentation efficiency: Evidence for the mobile proton model. *J Am Chem Soc* **118**, 8365-8374
306. Harrison, A. G. und Young, A. B. (2005) Fragmentation reactions of deprotonated peptides containing proline. The proline effect. *J Mass Spectrom* **40**, 1173-1186
307. Yalcin, T., Csizmadia, I. G., Peterson, M. R. und Harrison, A. G. (1996) The structure and fragmentation of B-n ( $n \geq 3$ ) ions in peptide spectra. *J Am Soc Mass Spectrom* **7**, 233-242
308. Fischer, L., Chen, Z. A. und Rappsilber, J. (2013) Quantitative cross-linking/mass spectrometry using isotope-labelled cross-linkers. *J Proteomics* **88**, 120-128
309. Kukacka, Z., Rosulek, M., Strohal, M., Kavan, D. und Novak, P. (2015) Mapping protein structural changes by quantitative cross-linking. *Methods* **89**, 112-120
310. Davril, M. und Han, K. K. (1976) Purification of a lysinonorleucine cross-linked peptide fraction from porcine aorta elastin. *Int J Pept Protein Res* **8**, 177-181

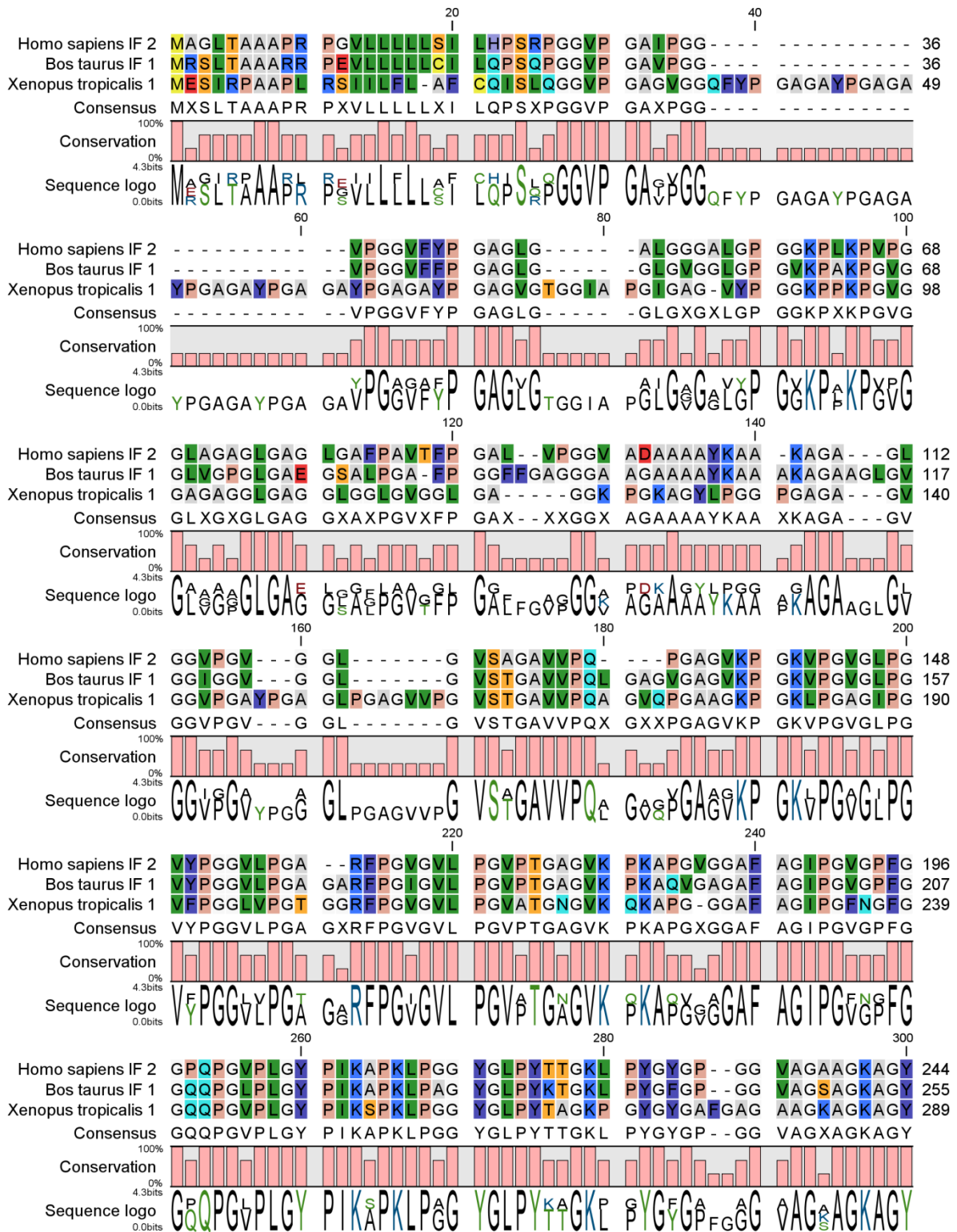


311. Daamen, W. F., Hafmans, T., Veerkamp, J. H. und van Kuppevelt, T. H. (2005) Isolation of intact elastin fibers devoid of microfibrils. *Tissue engineering* **11**, 1168-1176
312. Sandberg, L. B., Weissman, N. und Smith, D. W. (1969) Purification and Partial Characterization of a Soluble Elastin-Like Protein from Copper-Deficient Porcine Aorta. *Biochemistry* **8**, 2940-2945
313. Broekelmann, T. J., Ciliberto, C. H., Shifren, A. und Mecham, R. P. (2008) Modification and functional inactivation of the tropoelastin carboxy-terminal domain in cross-linked elastin. *Matrix Biol* **27**, 631-639
314. Nonaka, R., Sato, F. und Wachi, H. (2014) Domain 36 of tropoelastin in elastic fiber formation. *Biol Pharm Bull* **37**, 698-702
315. Gerber, G. E. und Anwar, R. A. (1975) Comparative studies of the cross-linked regions of elastin from bovine ligamentum nuchae and bovine, porcine and human aorta. *Biochem J* **149**, 685-695
316. Kagan, H. M., Williams, M. A., Williamson, P. R. und Anderson, J. M. (1984) Influence of sequence and charge on the specificity of lysyl oxidase toward protein and synthetic peptide substrates. *J Biol Chem* **259**, 11203-11207
317. Chou, P. Y. und Fasman, G. D. (1974) Conformational Parameters for Amino-Acids in Helical, Beta-Sheet, and Random Coil Regions Calculated from Proteins. *Biochemistry* **13**, 211-222
318. Baig, K. M., Vlaovic, M. und Anwar, R. A. (1980) Amino acid sequences C-terminal to the cross-links in bovine elastin. *Biochem J* **185**, 611-616
319. Umeda, H., Aikawa, M. und Libby, P. (2011) Liberation of desmosine and isodesmosine as amino acids from insoluble elastin by elastolytic proteases. *Biochem Biophys Res Commun* **411**, 281-286
320. Kumashiro, K. K., Kim, M. S., Kaczmarek, S. E., Sandberg, L. B. und Boyd, C. D. (2001) C-13 cross-polarization/magic angle spinning NMR studies of alpha-elastin preparations show retention of overall structure and reduction of mobility with a decreased number of cross-links. *Biopolymers* **59**, 266-275
321. Hiraoka, B. Y., Fukasawa, K., Fukasawa, K. M. und Harada, M. (1980) Identification and quantification of alpha-amino adipic acid in bovine dentine phosphoprotein. *J Biochem* **88**, 373-377
322. Sell, D. R., Strauch, C. M., Shen, W. und Monnier, V. M. (2007) 2-Aminoadipic acid is a marker of protein carbonyl oxidation in the aging human skin: effects of diabetes, renal failure and sepsis. *Biochemical J* **404**, 269-277
323. Requena, J. R., Chao, C. C., Levine, R. L. und Stadtman, E. R. (2001) Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 69-74

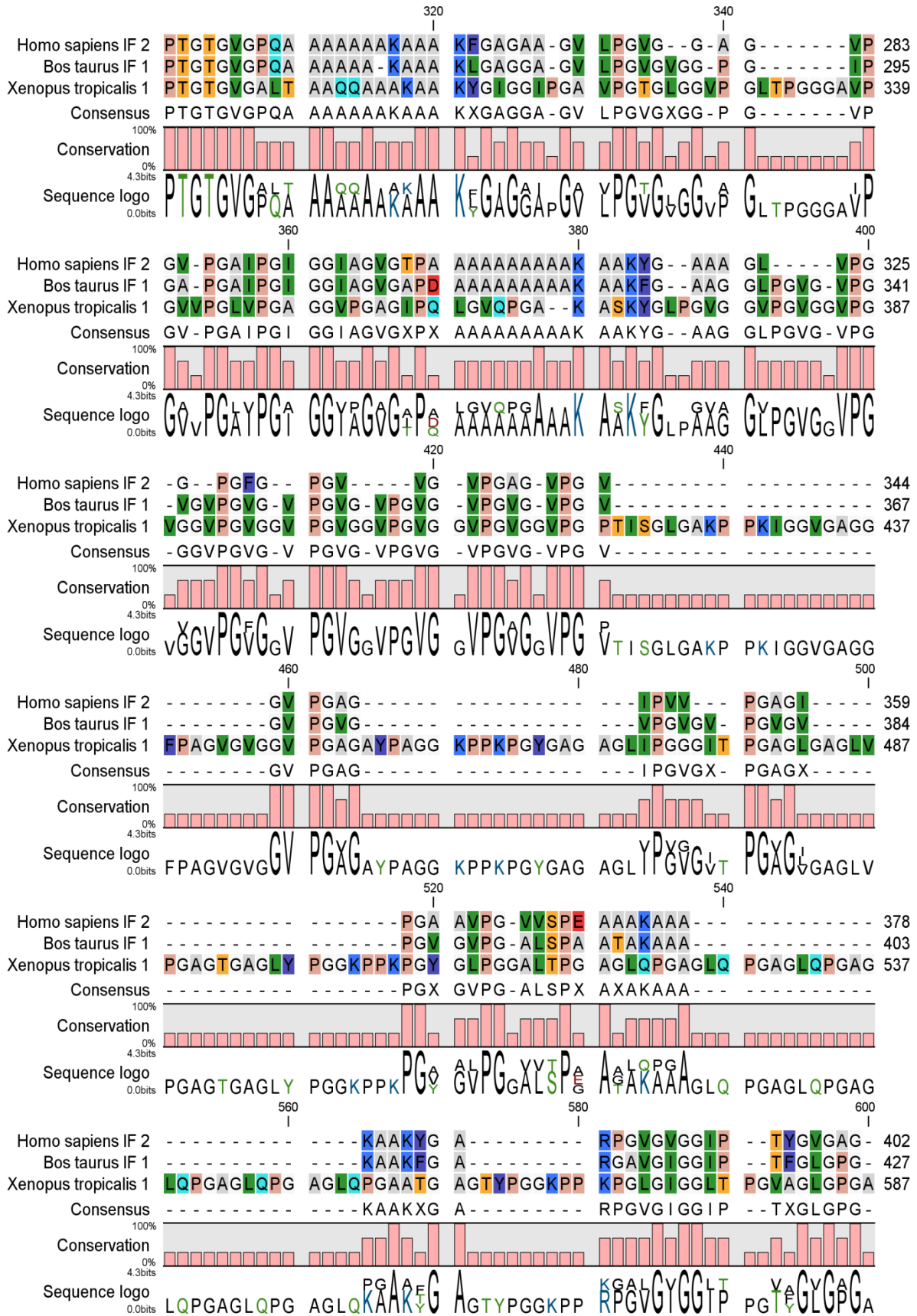
324. Baldock, C., Koster, A. J., Ziese, U., Rock, M. J., Sherratt, M. J., Kadler, K. E., Shuttleworth, C. A. und Kielty, C. M. (2001) The supramolecular organization of fibrillin-rich microfibrils. *J Cell Biol* **152**, 1045-1056
325. Taverner, T., Hall, N. E., O'Hair, R. A. J. und Simpson, R. J. (2002) Characterization of an antagonist interleukin-6 dimer by stable isotope labeling, cross-linking, and mass spectrometry. *J Biol Chem* **277**, 46487-46492
326. Ihling, C., Schmidt, A., Kalkhof, S., Schulz, D. M., Stingl, C., Mechtler, K., Haack, M., Beck-Sickinger, A. G., Cooper, D. M. F. und Sinz, A. (2006) Isotope-labeled cross-linkers and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for structural analysis of a protein/peptide complex. *J Am Soc Mass Spectrom* **17**, 1100-1113
327. Mithieux, S. M., Wise, S. G., Raftery, M. J., Starcher, B. und Weiss, A. S. (2005) A model two-component system for studying the architecture of elastin assembly in vitro. *J Struct Biol* **149**, 282-289
328. Dyksterhuis, L. B., Baldock, C., Lammie, D., Wess, T. J. und Weiss, A. S. (2007) Domains 17-27 of tropoelastin contain key regions of contact for coacervation and contain an unusual turn-containing crosslinking domain. *Matrix Biol* **26**, 125-135
329. Djajamuliadi, J., Kagawa, T. F., Ohgo, K. und Kumashiro, K. K. (2009) Insights into a putative hinge region in elastin using molecular dynamics simulations. *Matrix Biol* **28**, 92-100
330. Partridge, S. M., Elsdon, D. F., Thomas, J., Dorfman, A., Telser, A. und Ho, P. L. (1966) Incorporation of labelled lysine into the desmosine cross-bridges in elastin. *Nature* **209**, 399-400
331. Sato, F., Wachi, H., Ishida, M., Nonaka, R., Onoue, S., Urban, Z., Starcher, B. C. und Seyama, Y. (2007) Distinct steps of cross-linking, self-association, and maturation of Tropoelastin are necessary for elastic fiber formation. *J Mol Biol* **369**, 841-851
332. Debelle, L., Alix, A. J., Wei, S. M., Jacob, M. P., Huvenne, J. P., Berjot, M. und Legrand, P. (1998) The secondary structure and architecture of human elastin. *Eur J Biochem* **258**, 533-539
333. Tamburro, A. M. und Guantieri, V. (1991) Classical and fractal description of elastin structure. in *Ecological Physical Chemistry* (Rossi, C. als Editor), Elsevier, Amsterdam.
334. Muiznieks, L. D. und Weiss, A. S. (2007) Flexibility in the solution structure of human tropoelastin. *Biochemistry* **46**, 8196-8205
335. Samouillan, V., Andre, C., Dandurand, J. und Lacabanne, C. (2004) Effect of water on the molecular mobility of elastin. *Biomacromolecules* **5**, 958-964
336. Hovee, C. A. und Flory, P. J. (1974) The elastic properties of elastin. *Biopolymers* **13**, 677-686

337. Sayle, R. A. und Milnerwhite, E. J. (1995) Rasmol - Biomolecular Graphics for All. *Trends Biochem Sci* **20**, 374-376

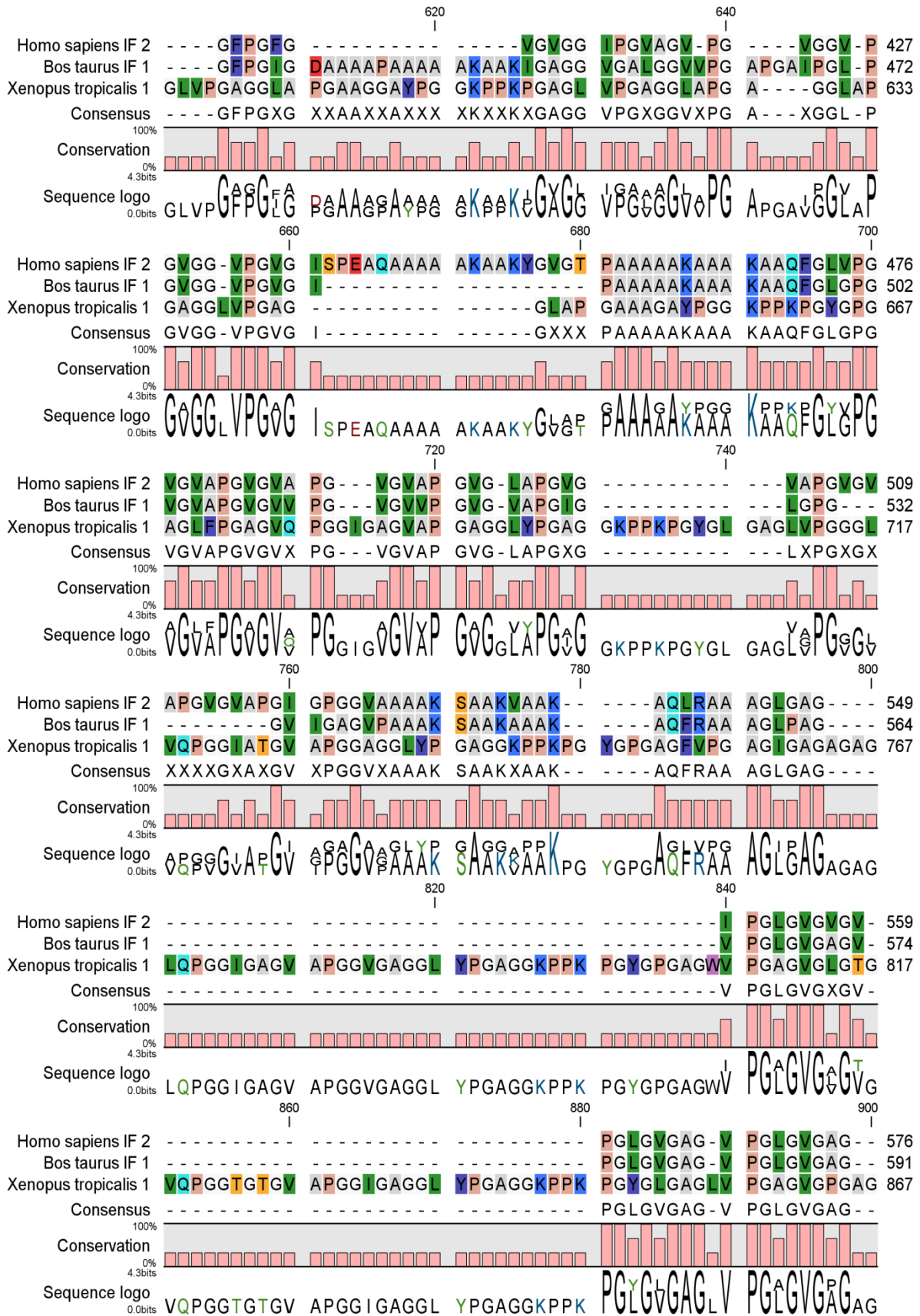
# 8 Anhang



# Anhang

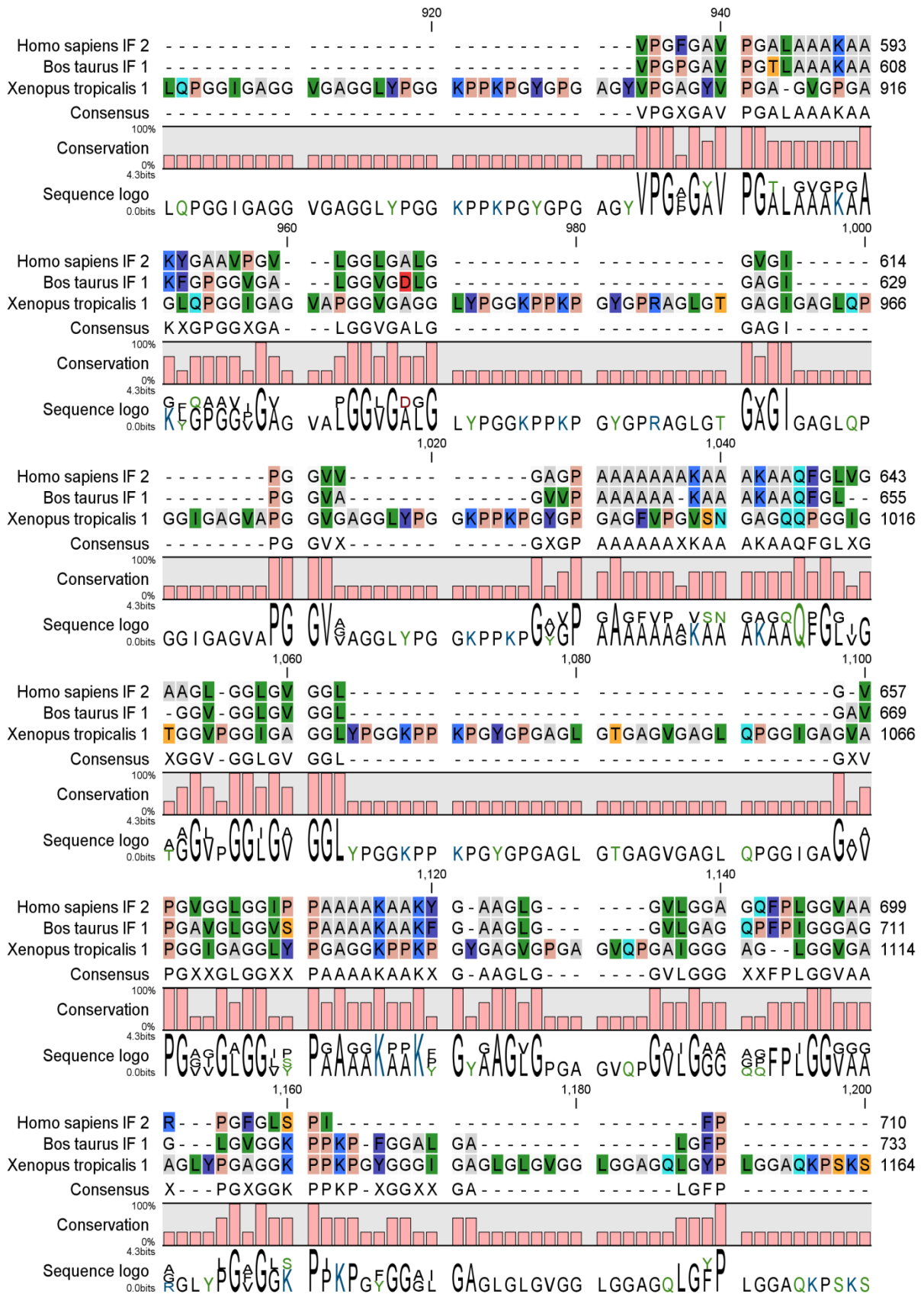


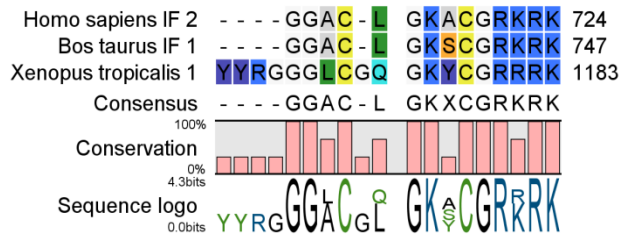
# Anhang





# Anhang





**Abb. A. 1: Sequenzalignierung der kanonischen TE-Sequenzen aus *HSA*, *BTA* und *XTR* (TE1)**

Unter den drei TE-Sequenzen der drei Organismen ist darüber hinaus die ermittelte Konsensussequenz dargestellt. Die Konservierung der entsprechenden Aminosäure ist als rosa Balken dargestellt. Aminosäuren sind entsprechend gängiger Kriterien zur Klassifikation von Aminosäuren gemäß dem Rasmol-Aminosäurefarbschema unterschiedlich farblich markiert (337): violett (Tyrosin, Phenylalanin), gelb (Cystein, Methionin), grün (Leucin, Isoleucin, Valin), grau (Alanin), weiß (Glycin), blau (Lysin, Arginin), türkis (Asparagin, Glutamin), pink (Tryptophan), orange (Serin, Threonin), rot (Aspartat, Glutamat), hellblau (Histidin).

```
>TE-2|ELN_FROG-2 OS=Xenopus tropicalis
```

```
MRGSILLQVSLLLCLVGC SLQGGTGA VQSPVSSPLAVKAGGRYPQFGPQGYQQGYQQGPTGIRNGYEAGYGVKAG  

KPAAGSLGVLPA GKQKPGYGNGRYPSNFQQQIGAKPSKAGYGPVGGVVRGIGAQP GYGNGLYPSNLQQQIGGK  

PPKAGYGAPAGGLPNVGVQPGYGNGLYPSNVQQPGIGGKPPKAGYGS PAGVLPGAGVQPGF LINGAGRFP SNIQQP  

GFGSKPSKAGYGP GNYPRFGAQAGYGA KASKAGLGSKPSKAGAFQQPYP SGLGSKPSKAGY P QGVGNYP SNI PQQ  

GAFQQPYPGGPQEYIQGAAGYPNTY PQQGLGAKPSKAGAYQQPYPNVAGGYPQPIGNYPSSIQQQGLGAKPSKAG  

AFQQPYPNGAYQQQYPNSAYQQQYPNGLN NFLGNGKQGQVVKSPYGLGALGKSSKQGALGKFPYKSQPLPADA  

LGYDSKSLKNSGAQLPFASQAGY PDPASVKYGGGVPVYGPQGAYPDPSAIKYG GVPQYPETASSPISTLEEDLSQ  

NVPLEGTQLIAAGPTTPTTQASPSTL KQKAYKVPEEQAA YRFYGTGYQCAEC
```

**Abb. A. 2: Aminosäuresequenz von TE2 aus *XTR***

Lysine in Quervernetzungsmotiven sind fett markiert.



## Anhang

**Tab. A. 1: Aminosäurezusammensetzung der kanonischen TE IF aus den drei Organismen *HSA* (IF 3), *BTA* (IF 1) und *XTR* (TE1)**

Dargestellt sind alle Aminosäuren, die in monomerem Elastin (TE) von mindestens einem der drei Organismen vorkommen. Die relative Abundanz ist farblich kodiert angezeigt und reicht von dunkelgrün (0 %) bis bordeauxrot (38,7 %).

Aminosäure	<i>HSA</i>	<i>BTA</i>	<i>XTR</i>
G	29,1	31,9	38,7
A	21,5	21,1	13,7
V	12,8	12,6	7,3
P	12,6	11,9	15,5
L	5,9	6,0	6,2
K	4,6	5,3	4,6
F	2,1	2,9	1,0
I	2,1	2,5	2,4
Y	2,0	1,0	4,4
S	1,7	1,0	0,6
T	1,4	1,1	2,1
Q	1,3	1,2	2,6
R	1,3	0,7	0,5
E	0,7	0,1	0,0
D	0,4	0,4	0,0
C	0,3	0,3	0,2
H	0,1	0,0	0,0
N	0,0	0,0	0,3
W	0,0	0,0	0,1

## Anhang

>sp|P15502-2|ELN\_HUMAN Isoform 2 of Elastin OS=Homo sapiens GN=ELN

MAGLTAAAPRPGVLLLLLSILHPSRPGGVPGAIPGGVPGGVFYPGAGLGGALGGGALGPGG**K**PLKPVPGGLAGAGL  
GAGLGAFPAVTFPGALVPGGVADAAAAY**KAAK**AGAGLGGVPGVGGGLGVSAAGAVVPQPGAGV**K**PKGVPGVGLPGVY  
PGGVLPGARFPVGVGLPGVPTGAGV**KPK**APGVGGAFAGIPGVGPFGGPQPGVPLGYPI**KAP**KLPGGYGLPYTTGK  
LPYGYGPGGVAGAAGKAGYPTGTGVGPQAAAAAA**KAAK**AFGAGAAGVLPVGGAGVPGVPGAIPGIGGIAGVGT  
PAAAAAA**KAAK**YGAAGLVPGGPGFGPGVVGVPAGVPGVPGAGIPVVPAGAGIPGAAVPGVVSPEAA**KAA**  
AA**KAAK**YGARPGVGVGGIPTYGVGAGGFPGFGVGVGGIPGVAGVPGVGGVPGVGGVPGVVISPEAQAAAA**KAA**  
KYGVGTAAAA**KAAK**AAQFGLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGLAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGIGPGGVA  
AAKSAAKVAAKQLRAAAGLGGAGIPGLGVGVPGVGLGVGAGVPGVGLGVGAGVPGFAGVPGALAA**KAAK**YGAAVP  
GVLGGLGALGGVGI PGGVVAGPAAAAAA**KAAK**AAQFGLVGAAGLGGGLGVGGLGVPGVGGGGIPAAAA**KAA**  
KYGAAGLGGVLGGAGQFPLGGVAARPGFGLSPIFPGGACLKACGRKRK

>sp|P04985|ELN\_BOVIN Isoform 1 of Elastin OS=Bos taurus GN=ELN PE=1 SV=1

MRSLTAAARRPEVLLLLLILQPSQPGGVPGAVPGGVPGGVFFPGAGLGGGLGVGGLGPGV**K**PAKPGVGGVLVGPGL  
GAEGSALPGAFFPGGFFGAGGGAAGAAAAY**KAAK**AKAGAAGLVGGIGGGVGGGLGVSTGAVVPQLGAGVAGV**K**PKGV  
PGVGLPGVYPGVLPAGARFPGIGVLPVGPVPTGAGV**KPK**AQVAGAFAGIPGVGPFGGQPGPLGYPI**KAP**KL  
AGYGLPY**K**TGKLPYGFPGGAVSAGKAGYPTGTGVGPQAAAAAA**KAAK**ALGAGGAGVLPVGVGGPGIPGAPGA  
IPGIGGIAGVGAPDAAAAAA**KAAK**FGAAGGLPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGV  
GVGVPGVGVPGVGVPGALSPAATA**KAAK**AAKFGARGAVGIGGIPTFGLGPGGFPGIGDAAAA**KAAK**IG  
AGGVGALGGVVPGAPGAI PGLPGVGGVPGVGI PAAAA**KAAK**AAQFGLGPGVGVAPGVGVVPGVGVVPGVGVAP  
GIGLPGGVIGAGVPAAKSA**KAAK**AAQFRAAAGLPAGVPGVGLGVGAGVPGVGLGVGAGVPGVPGAVPG  
TLAA**KAAK**FGPGGVLGGVGLGGAGIPGGVAGVVPAAAAAA**KAAK**AAQFGLGGVGGGLGVGGLGAVPGAVGL  
GGVSPAAAA**KAAK**FGAAGLGGVLGAGQFPPIGGGAGGLGVGG**K**PKPKPFGGALGALGFPGGACLKSCGRKRK

>TE1|ELN\_FROG-1 OS=Xenopus tropicalis

MESIRPAAPLRSIILFLAFCQISLQGGVPGAGVGGQFYPGAGAYPGAGAYPGAGAYPGAGAYPGAGAYPGAGVGT  
GGIAPGIGAGVYPG**K**PKPGVGGAGAGGLGAGGLGGGLGVGGLGAGG**K**PKKAGYLPGGPGAGAGVGGVPGAYPGA  
GLPGAGVVPVSTGAVVPQAGVQPGAAG**K**PKLPGAGIPGVFPGGVLPVGTGGRFPVGVVLPVATGNGV**K**QKAPG  
GGAFAGIPGFNGFGGQPGVPLGYPI**K**SKLPGGYGLPYTAGKPGYGYGAFGAGAAG**K**AGKAGYPTGTGVGALTA  
AQQA**KAAK**YIGGI PGAVPGTGLGGVPLTPGGGAVPGVVPGLVPGAGGVPGAGIPQLGVQPG**K**ASKYGLPG  
VGGVPGVGGVPGVGGVPGVGGVPGVGGVPGVGGVPGVGGVPGPTISGLG**K**PKI GGVGAGGFPAAGVGGVPGA  
GAYPAGG**K**PKPGYAGAGLIPGGGITPGAGLGLVPGAGTGLAGLYPG**K**PKPGYGLPGGALTPGAGLQPGAG  
LQPGAGLQPGAGLQPGAGLQPGAGLQPGAATGAGTYPGG**K**PKPGLGIGGLTPGVAGLPGAGLVPGAGGLAPGA  
AGGAYPGG**K**PKPGAGLVPGAGGLAPGAGGLAPGAGGLVPGAGGLAPGAAAGAYPG**K**PKPGYGPAGLFPAGAG  
VQPGGIGAGVAPGAGGLYPGAGG**K**PKPGYGLGAGLVPGGGVLPQGGIATGVAPGGAGGLYPGAGG**K**PKPGYGP  
GAGFVPGAGIGAGAGAGLQPGGIGAGVAPGGVAGGLYPGAGG**K**PKPGYGPAGWVPAGAVGLGTGVQPGGTGT  
GVAPGGIGAGGLYPGAGG**K**PKPGYGLGAGLVPGAGVPGAGLQPGGIGAGGVGAGGLYPGG**K**PKPGYGPAGY  
VPGAGYVPGAGVPGAGLQPGGIGAGVAPGGVAGGLYPGG**K**PKPGYGPAGLGTGAGIGAGLQPGGIGAGVAP  
GGVAGGLYPGG**K**PKPGYGPAGFVPGVSNAGQQPGGIGTGGVPGGIGAGGLYPGG**K**PKPGYGPAGLGTGA  
GVGAGLQPGGIGAGVAPGGIGAGGLYPGAGG**K**PKPGYAGVGPAGVQPGAIGGGAGLGGVGAAGLYPGAGG**K**P  
PKPGYGGGIGAGLGLGVGGLGGAGQLGYPLGGAQ**K**PSKSYRGGGLCGQKCYCGRRRK

### Abb. A. 3: Modifizierte Aminosäuresequenzen von humanem, bovinem und Froschelastin zur Identifizierung intrapeptidaler Quervernetzungen mittels PEAKS

N-terminal liegende Lysine in Quervernetzungsdomänen sind fett dargestellt. In der modifizierten Datenbank gelöschte Sequenzen sind grau dargestellt.

**Tab. A. 2: In PEAKS als variable PTMs implementierte Massendifferenzen abhängig von dem Quervernetzungstyp und dem Quervernetzungsmotiv**

Motiv	Quervernetzungstyp			Organismus		
	Massendifferenz zu einem K [Da]					
	$\Delta$ -LNL	LNL	AA	<i>HSA</i>	<i>BTA</i>	<i>XTR</i>
KAAAK	322,1651	324,1797	321,1324	X	X	
KAAK	251,1280	253,1426	250,0953	X	X	X
KAGK	237,1123	239,1269	236,0796			X
KAPK	277,1436	279,1582	276,1109	X	X	
KASK	267,1229	269,1375	266,0902			X
KPAK	277,1436	275,1290	276,1109		X	
KPGK	263,1280	265,1426	262,0953	X	X	X
KPK	206,1065	208,1211	205,0738	X	X	
KPLK	319,1906	321,2052	318,1579	X		
KPPK	303,1593	305,1739	302,1266		X	X
KPSK	293,1385	295,1531	292,1058			X
KQK	237,1123	239,1269	236,0796			X
KSPK	293,1385	295,1531	292,1058			X
KTGK	269,1375	267,1229	268,1048		X	

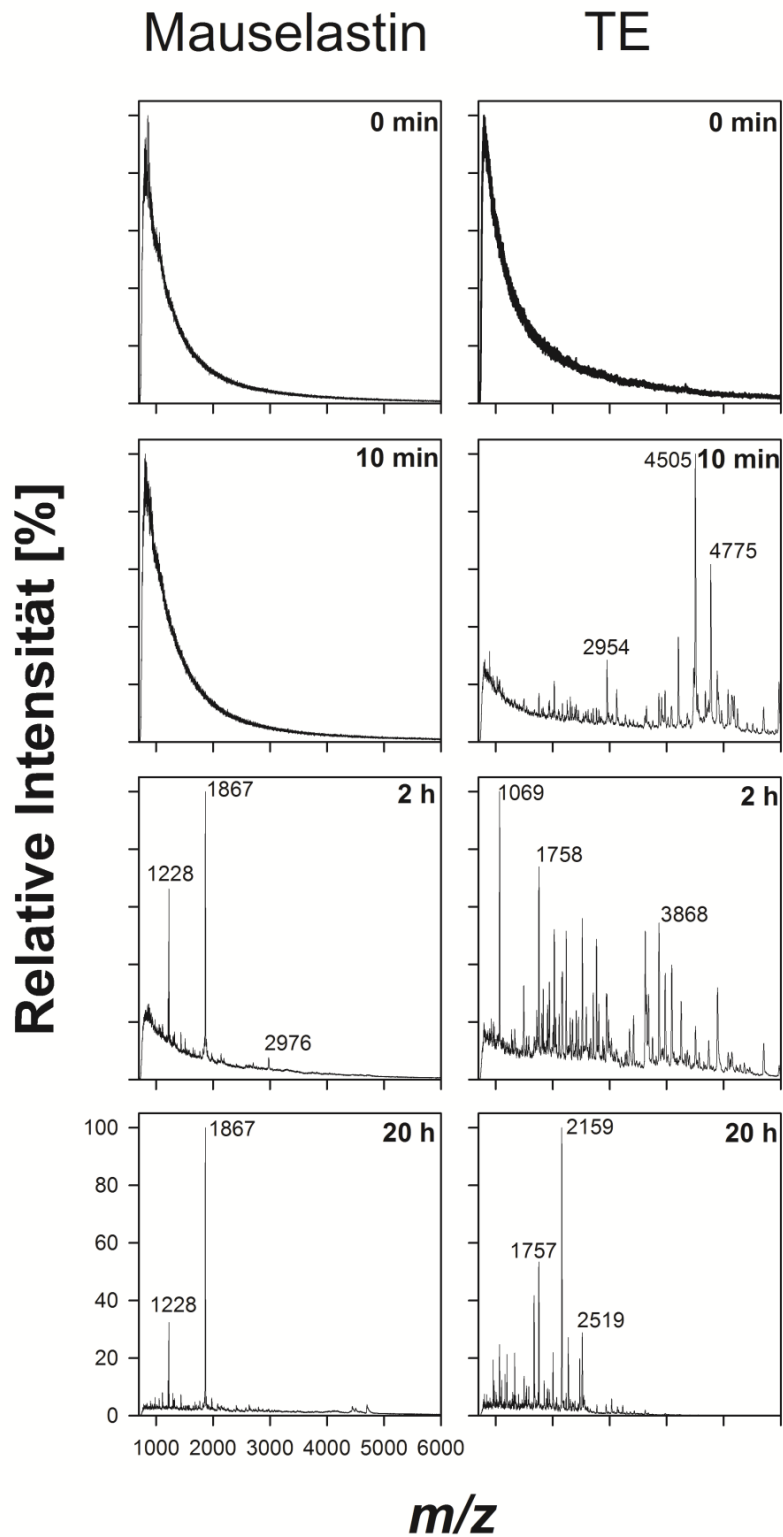
## Anhang

```
1  MAGLTAAAPR  PGVLLLLLSI  LHPSRPGGVP  GAIPGGVPPG  VFYPGAGLGA  LGGGALGPPG
61  KPLKVPVGG  AGAGLGAGLG  AFPAVTFPGA  LVPGGVADAA  AAYKAAKAGA  GLGGVPGVGG
121 LGVSAGAVVP  QPGAGVKPGK  VPGVGLPGVY  PGGVLPGARF  PGVGVLPGVP  TGAGVKPKAP
181  GVGGAFAIP  GVGPFGGPQP  GVPLGYPIKA  PKLPGGYGLP  YTTGKLPYGY  GPGGVAGAAG
241  KAGYPTGTG  GPQAAAAAAA  KAAAKFGAGA  AGVLPVGGGA  GVPGVPGAIP  GIGGIAGVGT
301  PAAAAAAAAA  AKAACYGAAA  GLVPGGPGFG  PGVGVVPGAG  VPGVGVPGAG  IPVVPGAGIP
361  GAAVPGVVSP  EAAAKAAAKA  AKYGARPGVG  VGGIPTYGVG  AGGFPGFVG  VGGIPGVAGV
421  PGVGGVPGV  GVPGVGISPE  AQAAAAAKAA  KYGVGTPAAA  AAKAAKAAQ  FGLVPGVVA
481  PGVGVAPGV  VAPGVGLAPG  VGVAPGVGVA  PGVGVAPGIG  PGGVAAAAKS  AAKVAAKAQL
541  RAAAGLGAG  PGLGVGVGVP  GLGVGAGVPG  LGVGAGVPGF  GAVPGALAAA  KAAKYGAAVP
601  GVLGGLGAL  GVGIPGGVVG  AGPAAAAAAA  KAAAKAAQFG  LVGAAGLGGL  GVGGLGVPGV
661  GGLGGIPPA  AAKAAKYGAA  GLGGVLGGAG  QFPLGGVAAR  PGFGLSPIFP  GGAACLGKACG
721  RKRK
```

Abb. A. 4: Sequenzabdeckung von humanem TE IF 2 proteolytisch verdaut mit PE

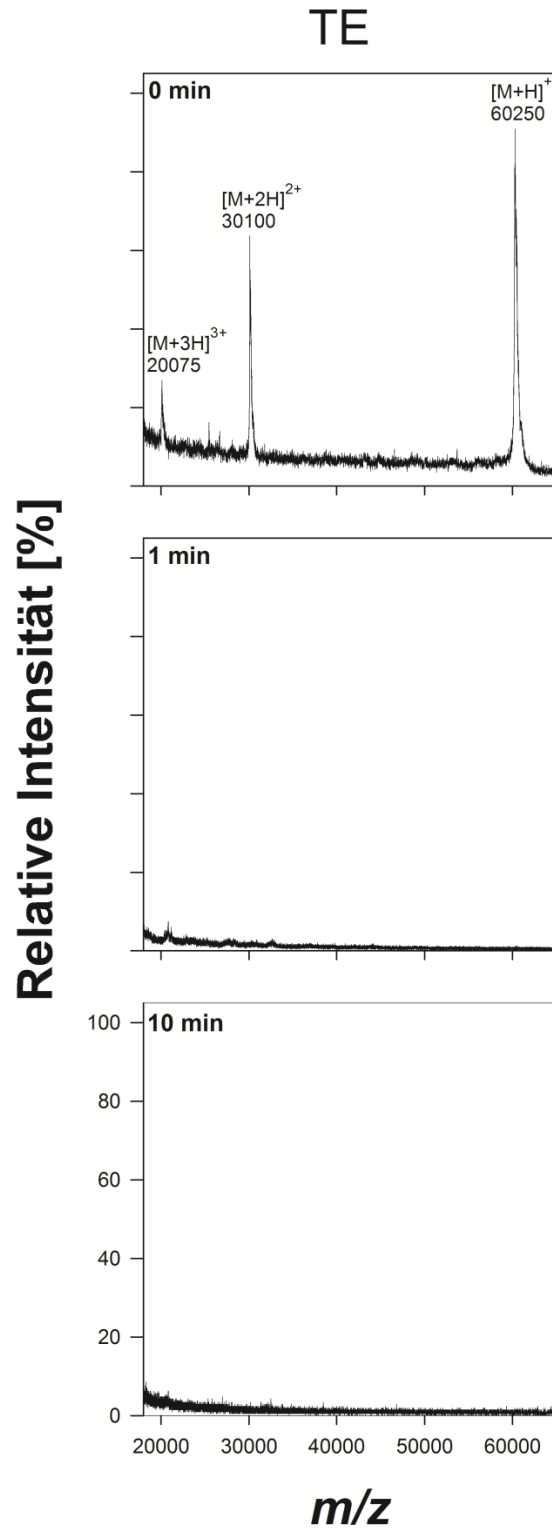
```
1  MAGLTAAAPR  PGVLLLLLSI  LHPSRPGGVP  GAIPGGVPPG  VFYPGAGLGA  LGGGALGPPG
61  KPLKVPVGG  AGAGLGAGLG  AFPAVTFPGA  LVPGGVADAA  AAYKAAKAGA  GLGGVPGVGG
121 LGVSAGAVVP  QPGAGVKPGK  VPGVGLPGVY  PGGVLPGARF  PGVGVLPGVP  TGAGVKPKAP
181  GVGGAFAIP  GVGPFGGPQP  GVPLGYPIKA  PKLPGGYGLP  YTTGKLPYGY  GPGGVAGAAG
241  KAGYPTGTG  GPQAAAAAAA  KAAAKFGAGA  AGVLPVGGGA  GVPGVPGAIP  GIGGIAGVGT
301  PAAAAAAAAA  AKAACYGAAA  GLVPGGPGFG  PGVGVVPGAG  VPGVGVPGAG  IPVVPGAGIP
361  GAAVPGVVSP  EAAAKAAAKA  AKYGARPGVG  VGGIPTYGVG  AGGFPGFVG  VGGIPGVAGV
421  PGVGGVPGV  GVPGVGISPE  AQAAAAAKAA  KYGVGTPAAA  AAKAAKAAQ  FGLVPGVVA
481  PGVGVAPGV  VAPGVGLAPG  VGVAPGVGVA  PGVGVAPGIG  PGGVAAAAKS  AAKVAAKAQL
541  RAAAGLGAG  PGLGVGVGVP  GLGVGAGVPG  LGVGAGVPGF  GAVPGALAAA  KAAKYGAAVP
601  GVLGGLGAL  GVGIPGGVVG  AGPAAAAAAA  KAAAKAAQFG  LVGAAGLGGL  GVGGLGVPGV
661  GGLGGIPPA  AKAACYGAA  GLGGVLGGAG  QFPLGGVAAR  PGFGLSPIFP  GGAACLGKACG
721  RKRK
```

Abb. A. 5: Sequenzabdeckung von humanem TE IF 2 proteolytisch verdaut mit *Nepenthes*-Extrakt



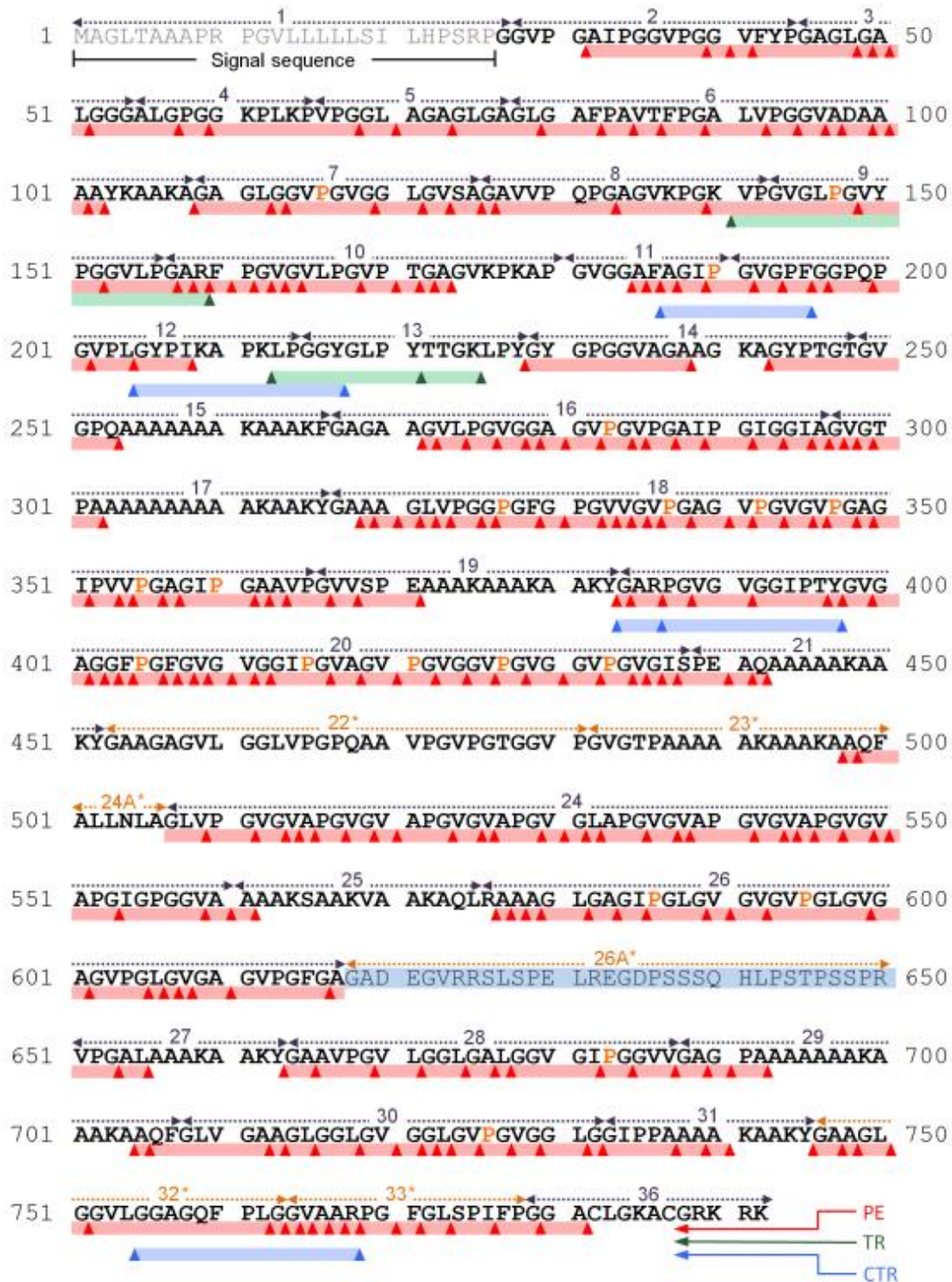
**Abb. A. 6: Zeitabhängige Degradation von TE und Elastin, gewonnen aus Mauseorta, durch *Nepenthes*-Extrakt**

Gezeigt sind MALDI-TOF Massenspektren von Proben, die zu dem jeweils dargestellten Zeitpunkt entnommen und mit der Matrix CHCA versetzt wurden. Die Messungen erfolgten im Linearmodus.



**Abb. A. 7: Zeitabhängige Degradation von TE durch *Nepenthes*-Extrakt**

Gezeigt sind MALDI-TOF Massenspektren von Proben, die zu dem jeweils dargestellten Zeitpunkt entnommen und mit der Matrix SA versetzt wurden. Die Messungen erfolgten im Linearmodus.



**Abb. A. 8: Spaltstellenanalyse von humanem Aortenelastin, verdaut mit den Proteasen PE, Chymotrypsin (CTR) und Trypsin (TR)**

Die jeweilige Domäne (basierend auf TE IF 3) ist gestrichelt über der Sequenz gezeigt. Spaltstellen sind durch aufrechte Dreiecke markiert (PE: rot, TR: grün, CTR: blau) und sequenzierte Regionen mit farblich entsprechenden Balken. Die ausgespleißte Domäne 26A ist blau hinterlegt. Identifizierte hydroxylierte Proline sind orange markiert. Entnommen aus Heinz *et al.* (232).



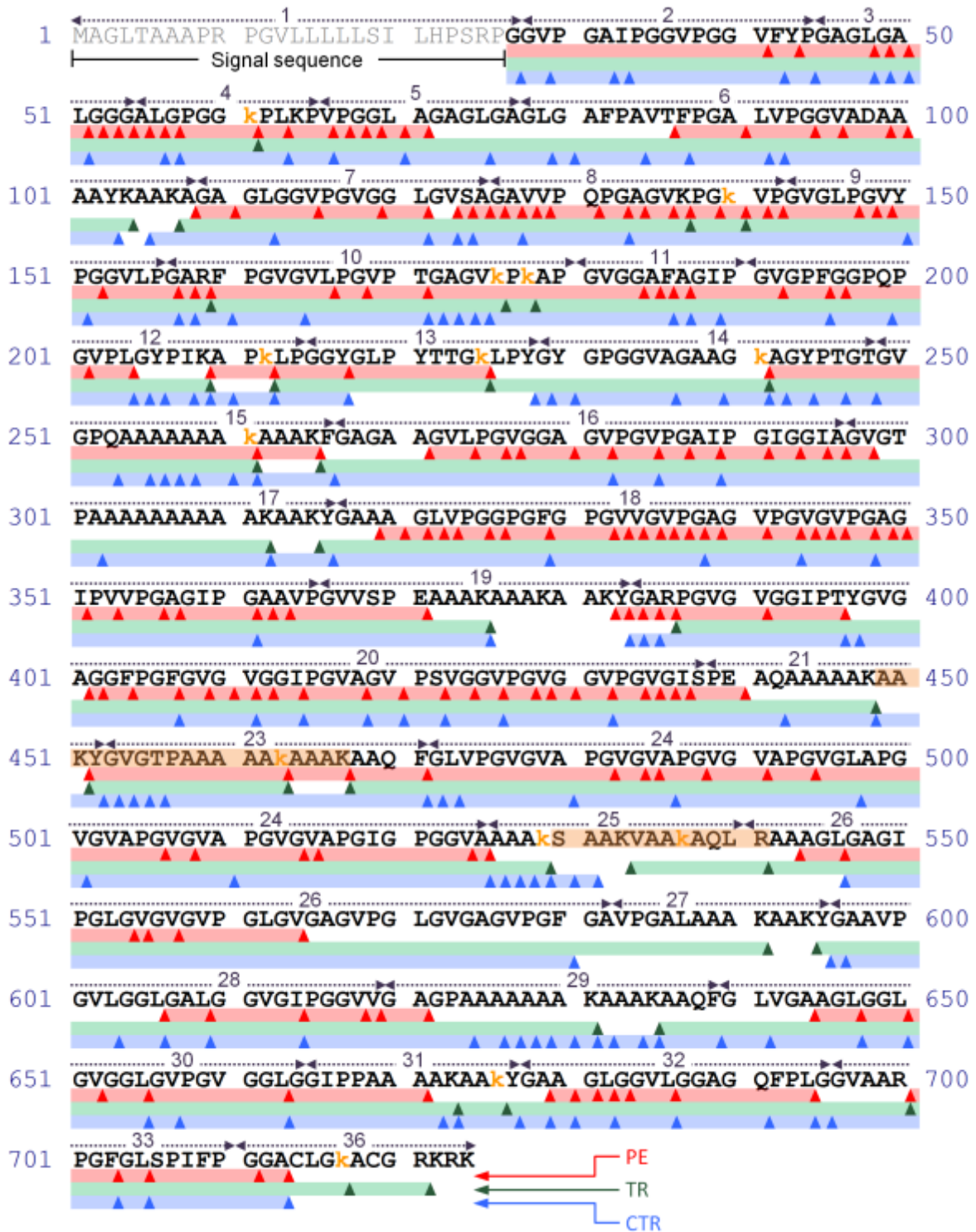
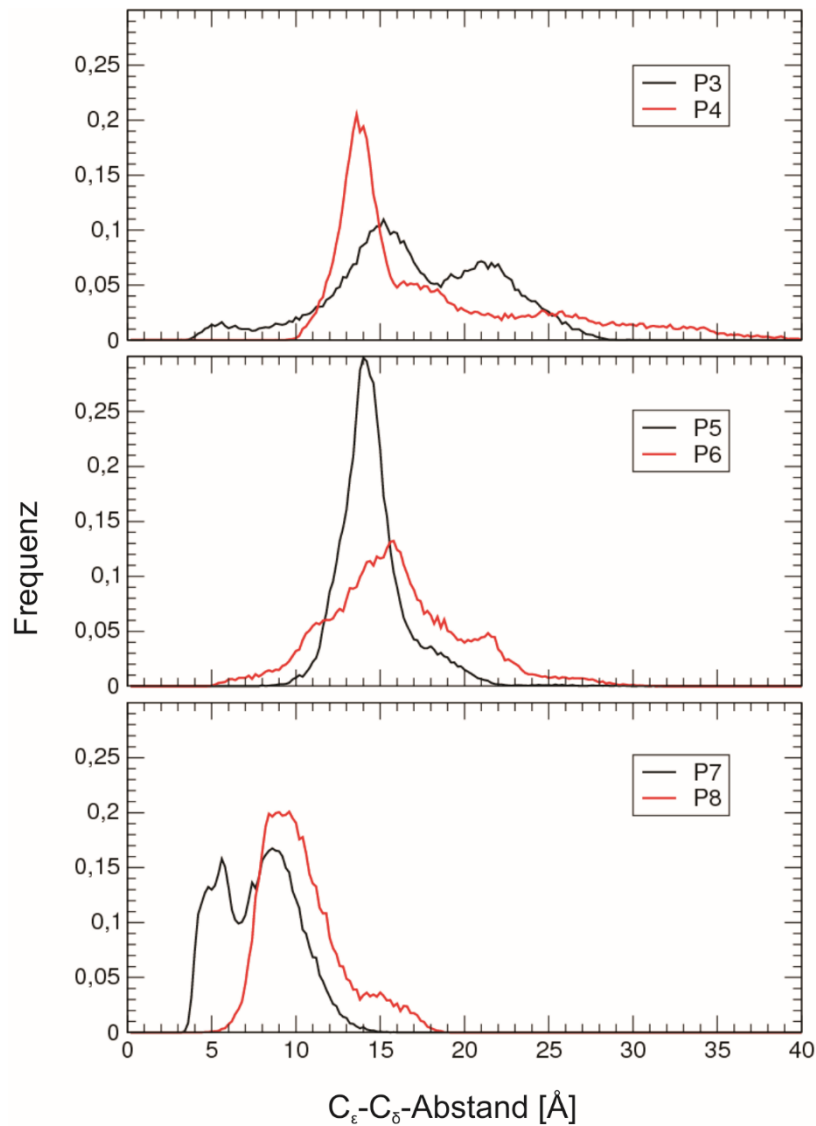


Abb. A. 9: Spaltstellenanalyse von ANAO-TE, verdaut mit den Proteasen PE, Chymotrypsin (CTR) und Trypsin (TR)

Die jeweilige Domäne (basierend auf TE IF 2) ist gestrichelt über der Sequenz gezeigt. Spaltstellen sind durch aufrechte Dreiecke markiert (PE: rot, TR: grün, CTR: blau) und sequenzierte Regionen mit farblich entsprechenden Balken. Identifizierte Allysine sind als kleine orange Buchstaben dargestellt. Die beiden identifizierten inter-peptidally quervernetzten Peptide sind innerhalb der Sequenz mit einem hellorange Balken markiert. Entnommen aus Heinz *et al.* (232).





**Abb. A. 10: Verteilung der Abstände zwischen C<sub>ε</sub>- und C<sub>δ</sub>-Atomen der Lysin- oder Allysinseitenketten innerhalb der 100 ns Moleküldynamiksimulation**

Die entsprechenden Peptidpaare mit Allysin (schwarz) und mit Lysin (rot) sind von oben nach unten entsprechend Tab. 1 dargestellt. Modifiziert nach Heinz *et al.* (232).

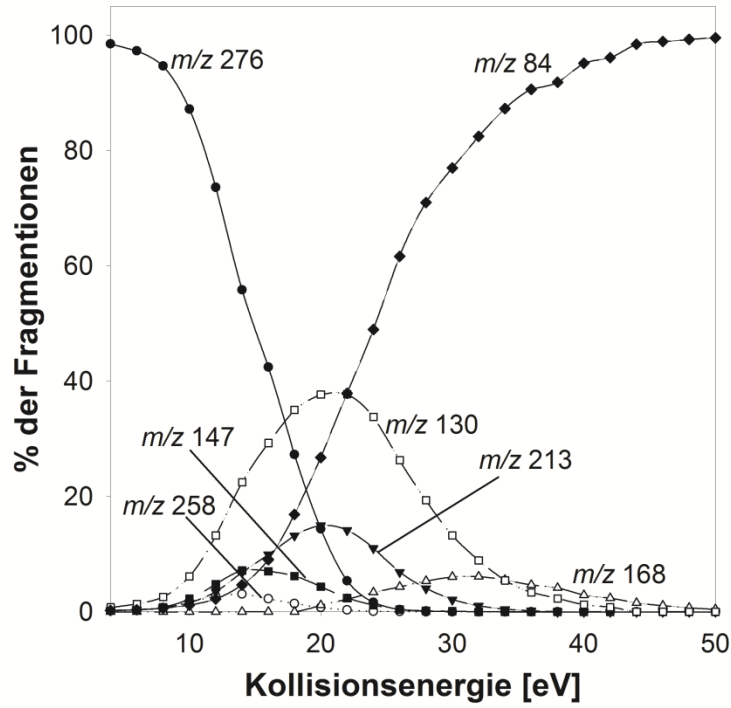


Abb. A. 11: Kollisionsenergieabhängige Fragmentierung von LNL durch CID mittels ESI-QqTOF MS

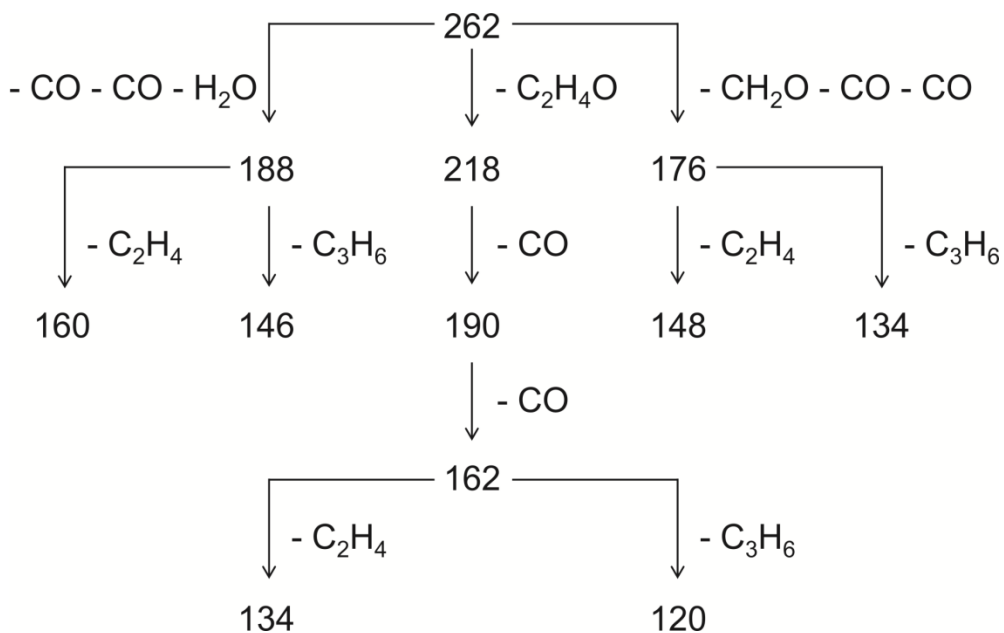
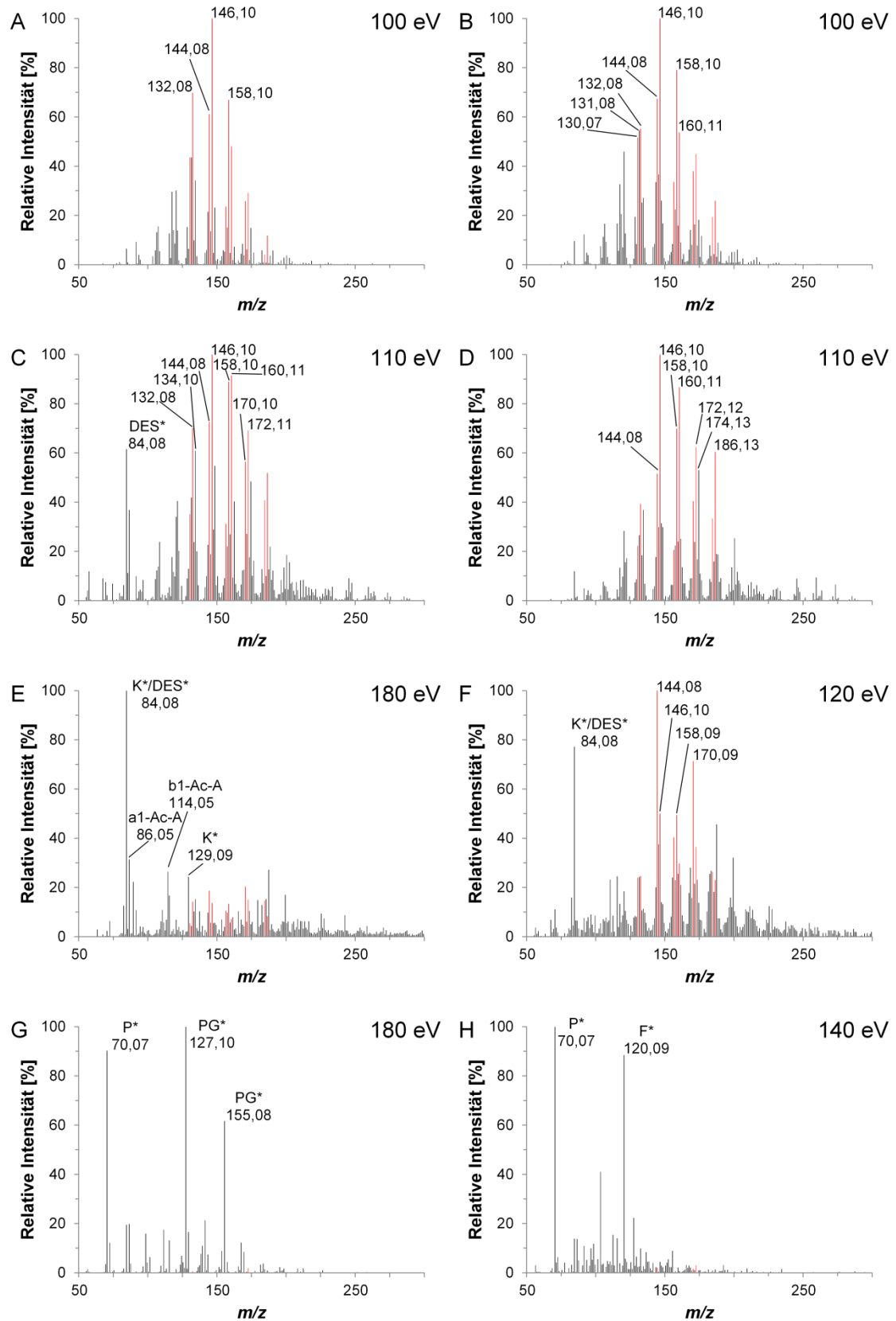


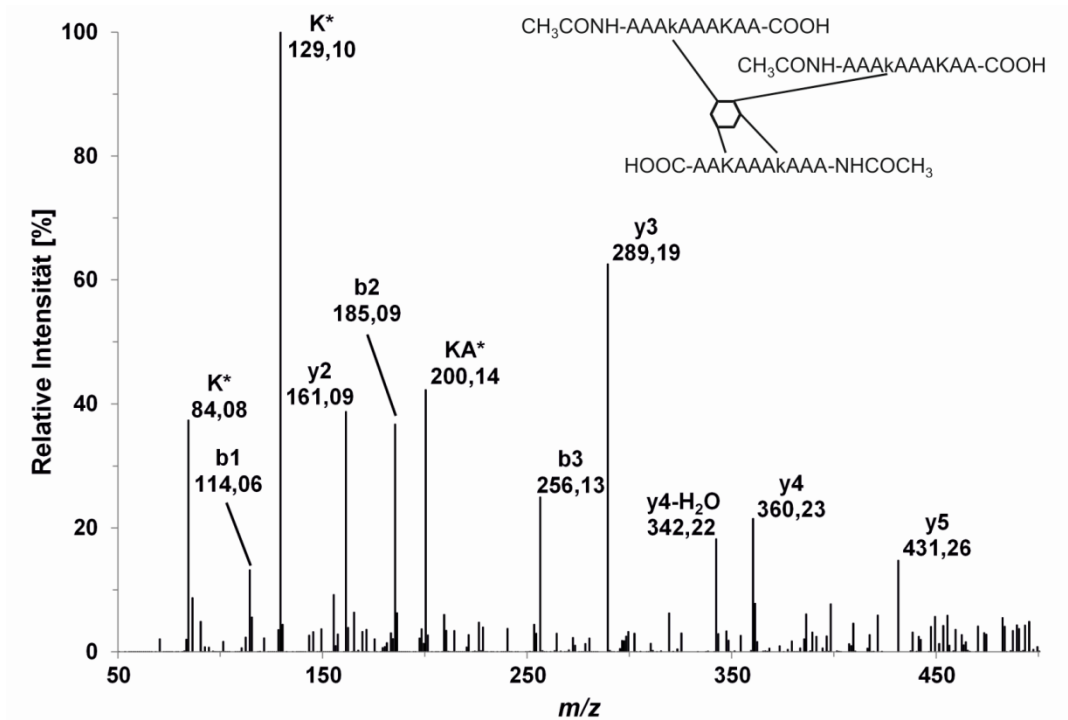
Abb. A. 12: CID-Pseudo-MS<sup>3</sup>-Fragmentierungsschema des DES/IDES-Fragmentions bei  $m/z$  262  
Entnommen aus Schröder *et al.* (227).



**Abb. A. 13: CID-Spektren von DES/IDES, deren Derivaten, DES/IDES-enhaltenden Peptiden und linearen Peptiden bei erhöhten Kollisionsenergien**

Die entsprechende Kollisionsenergie ist in dem jeweiligen Fragmentspektrum angegeben. Zu einer besseren Übersicht ist der  $m/z$ -Bereich nur bis 250 gezeigt. Die Spektren sind angeordnet wie folgt: [A] DES, [B] IDES,

[C] Pr-DES, [D] Pr-IDES, [E] *in vitro* quervernetztes, DES/IDES-enhaltendes Peptid, Ac-AAAKAAAKAA\_Ac-AAAKAAAKAA\_Ac-AAAKAAAKAA (2595,49 Da; Aminosäuren, die den DES-Ring ausbilden, sind fett markiert), [F] DES-enhaltendes Peptid aus boviner Aorta mit 1449,75 Da, [G] lineares Peptid GVLPGVG-GAGVPGVPGAIPGIGGIAGVGTPA (2521,37 Da), [H] lineares Peptid AARPGFGLSPIFPGGA (1514,74 Da). Die zwei linearen Peptide [G] und [H] wurden in TE-Verdauen mit der Protease PE identifiziert. Die elf Ionen, die im DESGET-Algorithmus berücksichtigt werden, sind rot markiert. Interne Fragmente, Immoniumionen und verwandte Ionen sind mit einem Sternchen markiert. Zugehörige Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt. Modifiziert nach Schröder *et al.* (227).



**Abb. A. 14: CID-Spektrum von Ac-AAAKAAAKAA\_Ac-AAAKAAAKAA\_Ac-AAAKAAAKAA bei einer Kollisionsenergie von 35 eV im  $m/z$ -Bereich 50-500**

Der Aufbau des Peptides ist als vereinfachte Strukturformel gegeben. Interne Fragmente, Immoniumionen und verwandte Ionen sind mit einem Sternchen markiert. Zugehörige Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt. Modifiziert nach Schröder *et al.* (227).

**Tab. A. 3: Aminosäureaustausche in Elastin von *BTA* verglichen mit IF 1**

<b>Mutation</b>	<b>Domäne</b>	<b>In UniProt beschrieben?</b>
V71A	5	X
L213V	12	✓
S249A	14	X
P292A	16	✓
L393V	19	✓
L424V	20	✓
A572V	26	✓
P595L	26	X
V637G	29	✓

## Anhang

**Tab. A. 4: Intraeptidal bifunktional quervernetzte Peptide aus BTA**

Lysinreste, die in die Quervernetzung eingebunden sind, sind unterstrichen. KP-Domänen sind blau und KA-Domänen sind rot dargestellt. Neben dem berechneten Masse-zu-Ladung-Verhältnis des einfach geladenen Vorläuferions ist zur besseren Übersichtlichkeit der gemessene Wert einschließlich des relativen Massenfehlers angegeben. Alle ausgewählten Vorläuferionen waren zweifach geladen. \*Das Orbitrap Fusion Tribrid MS wies bei diesen Messungen aufgrund eines falsch kalibrierten Quadrupols einen systematischen Massenfehler von 4,5 ppm auf. Die relative Standardabweichung lag jedoch bei 2,5 ppm, weswegen die Daten in die Auswertung einbezogen wurden.

<u>[M+H]<sup>+</sup></u> beobachtet	[M+H] <sup>+</sup> berechnet	$\Delta m$ [ppm]	Peptid	Domäne	Typ
1159,6837	1159,6833	0,3	LGPGV <u>K</u> PA <u>K</u> PGVG	4	LNL
1216,7103	1216,7047	4,6*	LGPGV <u>K</u> PA <u>K</u> PGVGG	4	LNL
1329,7947	1329,7888	4,5*	LGPGV <u>K</u> PA <u>K</u> PGVGGL	4	LNL
835,5031	835,5035	-0,3	V <u>K</u> PA <u>K</u> PGVG	4	LNL
1801,8763	901,4412	0,7	Y <u>K</u> AA <u>K</u> AGAA	6	AA
1260,7369	1260,7311	4,7*	GV <u>K</u> PG <u>K</u> VPGVGLP-Hyp-G	8	LNL
1520,8575	1520,8470	7,0*	<u>K</u> PG <u>K</u> VPGVGLP-Hyp-GVYPG	8	LNL
821,4877	821,4880	-0,3	GV <u>K</u> PG <u>K</u> VPG	8	LNL
693,4289	693,4293	-0,6	<u>K</u> AP <u>K</u> LPG	12	LNL
1036,5459	1036,5420	3,7*	AA <u>K</u> AA <u>K</u> LGAGGA	15	AA
965,5047	965,5049	0,0	A <u>K</u> AA <u>K</u> LGAGGA	15	AA
854,5089	854,5093	-0,5	<u>K</u> AA <u>K</u> IGAGGV	21	LNL
1155,6575	1155,6520	4,8*	<u>K</u> AA <u>K</u> FGPGGVGAL	27	LNL
1042,5717	1042,5678	3,7*	<u>K</u> AA <u>K</u> FGPGGVGA	27	LNL
1435,7767	1435,7691	5,3*	GAGGLGVGG <u>K</u> PP <u>K</u> PFGG	35	LNL
1136,6471	1136,6462	0,8	GLGVGG <u>K</u> PP <u>K</u> PF	35	LNL
1080,5881	1080,5836	4,2*	GVGG <u>K</u> PP <u>K</u> PFGG	35	LNL
1236,6793	1236,6734	4,7*	GG <u>K</u> PP <u>K</u> PFGGALGA	35	LNL
995,5341	995,5308	3,4*	GG <u>K</u> PP <u>K</u> PFGG	35	LNL
924,4961	924,4937	2,7	GG <u>K</u> PP <u>K</u> PFGG	35	LNL
810,4525	810,4508	2,1	GG <u>K</u> PP <u>K</u> PF	35	LNL

## Anhang

**Tab. A. 5: Interpeptidal bifunktional quervernetzte Peptide aus BTA**

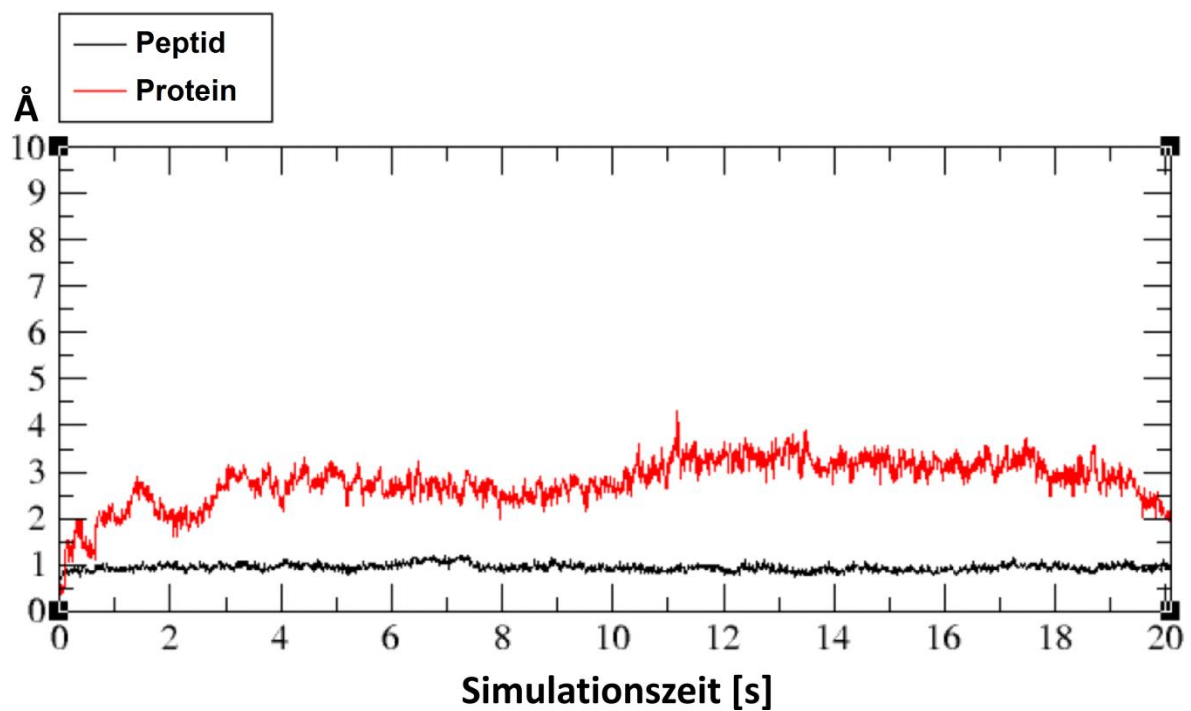
Lysinreste, die in die Quervernetzung eingebunden sind, sind unterstrichen. KP-Domänen sind blau und KA-Domänen sind rot dargestellt. Neben dem berechneten Masse-zu-Ladung-Verhältnis des einfach geladenen Vorläuferions ist der gemessene Wert einschließlich des relativen Massenfehlers angegeben.

<u>[M+H]<sup>+</sup></u> beobachtet	[M+H] <sup>+</sup> berechnet	$\Delta m$ [ppm]	Peptid $\alpha$	Domäne $\alpha$	Typ	Domäne $\beta$	Peptid $\beta$
1080,6404	1080,6412	-0,7	LGPGV <u>K</u> PA	4	LNL	15,17,19,21,23,25,27,29,31	A <u>K</u> AA
1014,5972	1014,5982	-1,0	LGPGV <u>K</u> PA	4	LNL	17,19,27,31	<u>K</u> F
1077,5940	1077,5939	0,2	LGPGV <u>K</u> PA	4	AA	15,17,19,21,23,25,27,29,31	A <u>K</u> AA
969,5716	969,5728	-1,2	A <u>K</u> PGVGG	4	LNL	6,15,17,19,21,23,25,27,29,31	A <u>A</u> <u>K</u>
969,5720	969,5728	-0,7	A <u>K</u> PGVGG	4	LNL	6,15,17,19,21,23,25,27,29,31	<u>K</u> AA
869,5452	869,5455	-0,3	<u>K</u> PGVGG	4	LNL	12	I <u>K</u>
733,4237	733,4243	-0,8	GV <u>K</u> PG	8	LNL	17,19,27,31	<u>K</u> F
867,4567	867,4571	-0,4	GV <u>K</u> PG	8	AA	15,17,19,21,23,25,27,29,31	AA <u>K</u> AA
777,4500	777,4505	-0,6	G <u>K</u> L <sup>13</sup> PY	13	LNL	6,15,17,19,21,23,25,27,29,31	<u>K</u> AA
791,4654	791,4662	-0,9	<u>K</u> L <sup>13</sup> PY	13	LNL	6,15,17,19,21,23,25,27,29,31	<u>K</u> AA
1089,5213	1089,5211	0,2	AG <u>K</u> AGYPT	14	AA	6	A <u>K</u> AG
1174,5744	1174,5739	0,4	AG <u>K</u> AGYPT	14	AA	15,17,19,21,23,25,27,29,31	AA <u>K</u> AA
1387,6859	1387,6852	0,5	AG <u>K</u> AGYPT	14	AA	15	A <u>K</u> L <sup>15</sup> GAGGA
1032,4998	1032,4997	0,2	<u>K</u> AGYPT	14	AA	6	A <u>K</u> AGA
1054,5531	1054,5527	0,4	AA <u>A</u> <u>K</u> L <sup>15</sup> GAGGA	15	AA	6,15,17,19,21,23,25,27,29,31	A <u>K</u> A
920,5196	920,5200	-0,4	A <u>K</u> L <sup>15</sup> GAGGA	15	LNL	17,19,27,31	<u>K</u> F
886,5352	886,5356	-0,5	A <u>K</u> L <sup>15</sup> GAGGA	15	LNL	12,13,15,21	<u>K</u> I / <u>K</u> L
903,4567	903,4571	-0,4	AA <u>K</u> FGAA	17,31	AA	6,15,17,19,21,23,25,27,29,31	<u>K</u> AA
769,4236	769,4243	-0,5	A <u>K</u> FGA	17,19,31	LNL	17,19,27,31	<u>K</u> F
735,4395	735,4400	-0,5	<u>K</u> FGAA	17,31	LNL	12,13,15,21	<u>K</u> I
872,5197	872,5200	0,2	A <u>K</u> I <sup>21</sup> GAGGV	21	LNL	6,10,12,14,15,17,19,21,23,25,27,29,31	<u>K</u> A
877,5138	877,5142	-0,4	<u>K</u> I <sup>21</sup> GAGGV	21	LNL	17,19,27,31	<u>K</u> F
1130,5944	1130,5953	-0,8	A <u>K</u> AQFRAA	25	AA	6,15,17,19,21,23,25,27,29,31	<u>K</u> AA
1003,5563	1003,5571	-0,8	A <u>K</u> FGPGGV	27	LNL	6,15,17,19,21,23,25,27,29,31	A <u>A</u> <u>K</u>
903,5294	903,5298	-0,5	<u>K</u> FGPGGV	27	LNL	12	I <u>K</u>
863,4982	863,4985	-0,4	<u>K</u> FGAAGL	31	LNL	6,15,17,19,21,23,25,27,29,31	A <u>K</u>

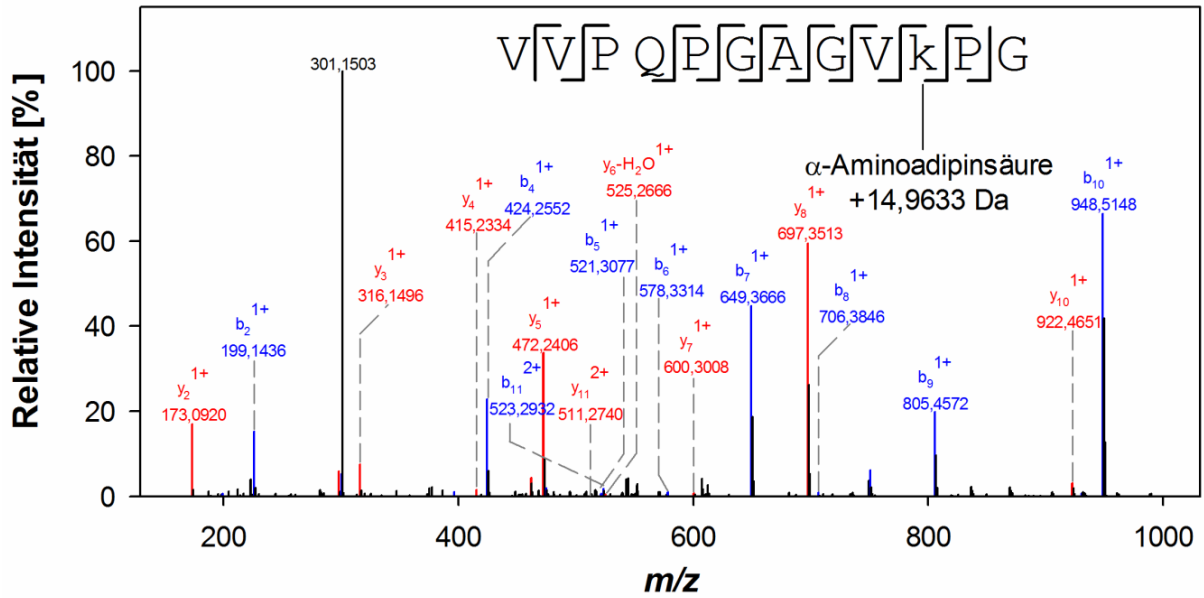
**Tab. A. 6: Interpeptidal tetrafunktional quervernetzte Peptide aus BTA**

Lysinreste, die in die Quervernetzung eingebunden sind, sind unterstrichen. KA-Domänen sind rot dargestellt. Neben dem berechneten Masse-zu-Ladung-Verhältnis des einfach geladenen Vorläuferions ist der gemessene Wert einschließlich des relativen Massenfehlers angegeben. Da DES/IDES intrinsisch einfach positiv geladen ist, ist kein weiteres Proton zur Ionisation notwendig.

M <sup>+</sup> beobachtet	M <sup>+</sup> berechnet	Δm [ppm]	Peptid 1	Domäne 1	Typ	Peptid 2	Peptid 3
1573,8321	1573,8333	-0,8	<u>K</u> AAAK <u>L</u> GAGGA	15	DES/IDES	AA <u>A</u> A <u>K</u>	<u>K</u> AA
1280,6609	1280,6633	-1,9	<u>K</u> AA <u>K</u> FGAA	17, 31	DES/IDES	A <u>K</u> A	AA <u>K</u>
1732,9016	1732,9016	0,0	A <u>K</u> AA <u>K</u> FGPGGV	27	DES/IDES	AA <u>A</u> A <u>K</u> A	A <u>K</u> AA

**Abb. A. 15: RMSD-Analyse des stabilen Peptid-PE-Komplexes innerhalb der 20 ns MD-Simulation**





**Abb. A. 16: CID-Spektrum des linearen Peptides VVPQPGAGV-Aad-PG aus humanem Aortenelastin**  
 b-Ionen und y-Ionen sind blau bzw. rot dargestellt. Gleiches gilt für damit verwandte Ionen (interne Fragmente, H<sub>2</sub>O-, NH<sub>3</sub>-Abspaltungen). Das entsprechende Vorläuferion war bei  $m/z$  560,8039;  $z = 2$ . Das Fragmentation bei  $m/z$  301,1503 konnte nicht zugeordnet werden.

## Anhang

**Tab. A. 7: Intrapeptidal bifunktional quervernetzte Peptide aus HSA**

Lysinreste, die in die Quervernetzung eingebunden sind, sind unterstrichen. KP-Domänen sind blau und KA-Domänen sind rot dargestellt. Neben dem berechneten Masse-zu-Ladung-Verhältnis des einfach geladenen Vorläuferions ist zur besseren Übersichtlichkeit der gemessene Wert einschließlich des relativen Massenfehlers angegeben. Alle ausgewählten Vorläuferionen waren zweifach geladen.

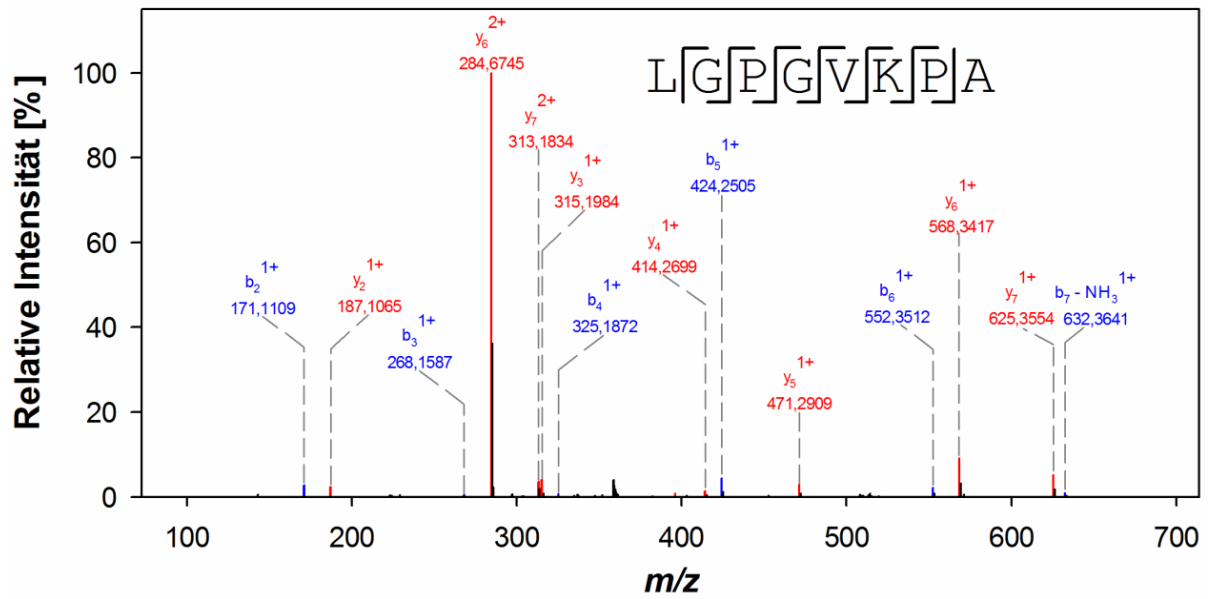
<u>[M+H]<sup>+</sup></u> beobachtet	[M+H] <sup>+</sup> berechnet	$\Delta m$ [ppm]	Peptid	Domäne	Typ
1441,8175	1441,8161	1,0	GGGALGPGG <u>K</u> PL <u>K</u> PVPG	4	LNL
1327,7749	1327,7732	1,3	GALGPGG <u>K</u> PL <u>K</u> PVPG	4	LNL
1270,7521	1270,7517	0,4	ALGPGG <u>K</u> PL <u>K</u> PVPG	4	LNL
1199,7147	1199,7146	0,2	LGPGG <u>K</u> PL <u>K</u> PVPG	4	LNL
1331,7691	1331,7680	0,8	AGV <u>K</u> PG <u>K</u> VPVGL-Hyp-G	8	LNL
1328,7217	1328,7208	1,0	AGV <u>K</u> PG <u>K</u> VPVGL-Hyp-G	8	AA
892,5249	892,525	0,0	AGV <u>K</u> PG <u>K</u> VPG	8	LNL
1315,7739	1315,7732	0,6	AGV <u>K</u> PG <u>K</u> VPVGLPG	8	LNL
1148,6429	1148,6421	0,7	GAGV <u>K</u> PK <u>A</u> PGVGG	10	LNL
1077,6055	1077,605	0,5	GAGV <u>K</u> PK <u>A</u> PGVGG	10	LNL
1020,5839	1020,5835	0,3	GV <u>K</u> PK <u>A</u> PGVGG	10	LNL
949,5467	949,5464	0,4	GV <u>K</u> PK <u>A</u> PGVGG	10	LNL
913,5141	913,5141	0,0	<u>K</u> AP <u>K</u> LPGGY	12	LNL

## Anhang

**Tab. A. 8: Interpeptidal bifunktional quervernetzte Peptide aus HSA**

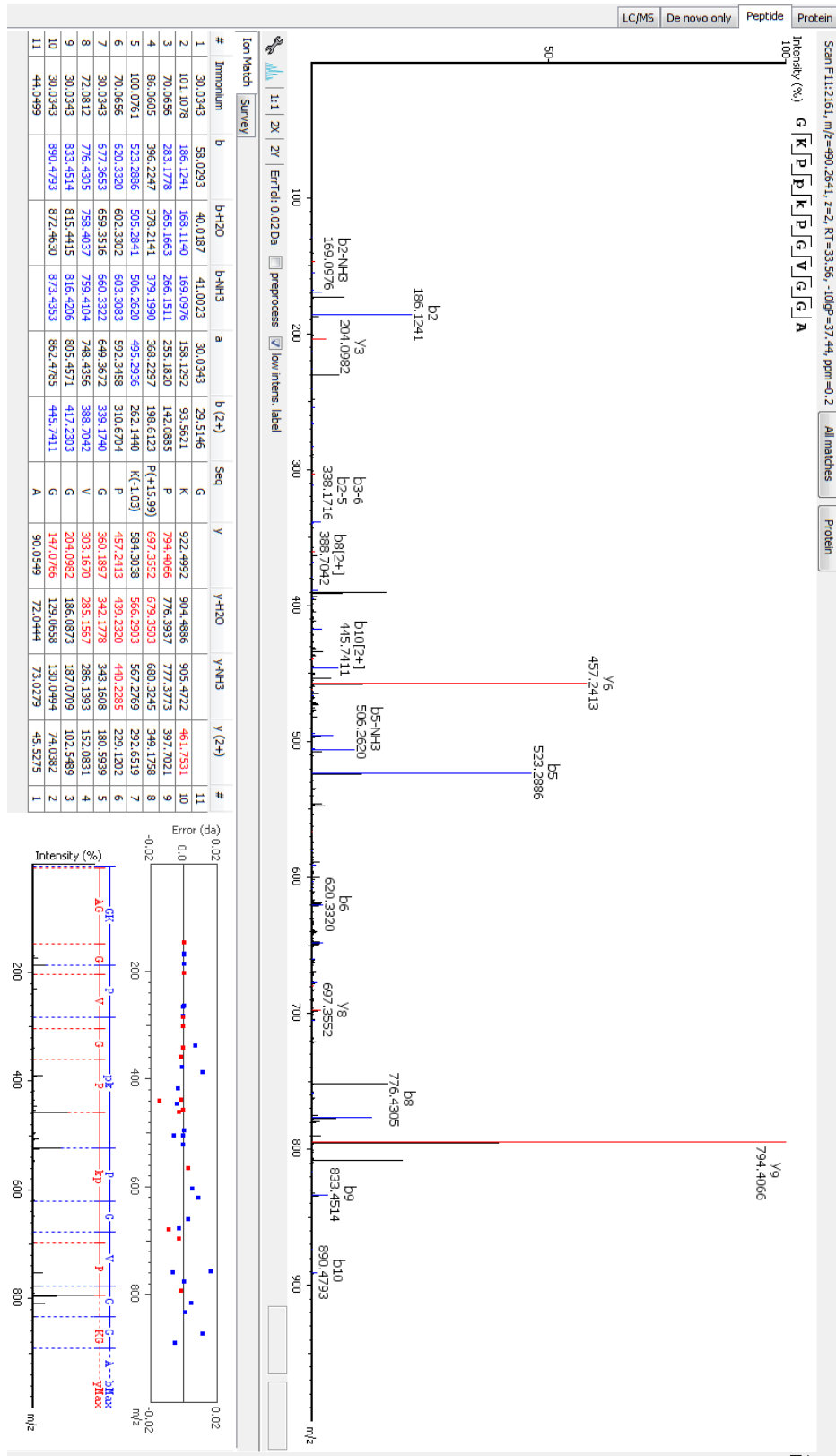
Lysinreste, die in die Quervernetzung eingebunden sind, sind unterstrichen. KP-Domänen sind blau und KA-Domänen sind rot dargestellt. Neben dem berechneten Masse-zu-Ladung-Verhältnis des einfach geladenen Vorläuferions ist zur besseren Übersichtlichkeit der gemessene Wert einschließlich des relativen Massenfehlers angegeben.

[M+H] <sup>+</sup> beobachtet	[M+H] <sup>+</sup> berechnet	Δm [ppm]	Peptid α	Domäne α	Typ	Domäne β	Peptid β
1066,6256	1066,6256	0,0	GALGPGG <u>K</u> PL	4	LNL	6,15,17,19,21,23,25,27,29,31	<u>AK</u>
1066,6253	1066,6256	-0,3	GALGPGG <u>K</u> PL	4	LNL	6,15,17,19,21,23,25,27,29,31	<u>KA</u>
1039,6142	1039,6147	-0,5	<u>K</u> VPGVGL- Hyp-G	8	LNL	6,15,17,19,21,23,25,27,29,31	<u>AK</u>
888,4459	888,4462	-0,3	G <u>K</u> L <u>P</u> Y	13	AA	14	G <u>K</u> A <u>G</u>
706,4141	706,4134	1,0	G <u>K</u> L <u>P</u> Y	13	LNL	ALLE/ALLE	<u>K</u>
777,4496	777,4506	-1,3	G <u>K</u> L <u>P</u> Y	13	LNL	6,15,17,19,21,23,25,27,29,31	<u>AK</u>
777,4502	777,4506	-0,5	G <u>K</u> L <u>P</u> Y	13	LNL	6,10,12,14,15,17,19,21,23,25, ,27,29,31	<u>KA</u>
1104,5577	1104,5572	0,5	TTG <u>K</u> L <u>P</u> Y	13	AA	14	AAG <u>K</u>
908,5089	908,5088	0,1	TTG <u>K</u> L <u>P</u> Y	13	LNL	ALLE/ALLE	<u>K</u>
1071,5726	1071,5722	0,4	TTG <u>K</u> L <u>P</u> Y	13	LNL	6	Y <u>K</u>
1050,5837	1050,5831	0,6	TTG <u>K</u> L <u>P</u> Y	13	LNL	6,15,17,19,21,23,25,27,29,31	AA <u>K</u>
979,5457	979,5459	-0,2	TTG <u>K</u> L <u>P</u> Y	13	LNL	6,15,17,19,21,23,25,27,29,31	<u>AK</u>
1071,5727	1071,5722	0,5	TTG <u>K</u> L <u>P</u> Y	13	LNL	6	Y <u>K</u>
1121,6201	1121,6202	-0,1	TTG <u>K</u> L <u>P</u> Y	13	LNL	15,17,19,21,23,27,29,31	AKAA
1128,5943	1128,5937	0,5	TTG <u>K</u> L <u>P</u> Y <u>G</u>	13	LNL	17,19,21,27,31	<u>K</u> Y
963,5257	963,5258	-0,1	AA <u>K</u> FGAGAA	15	LNL	6,10,12,14,15,17,19,21,23,25, ,27,29,31	<u>KA</u>
1017,4997	1017,4999	-0,2	AK <u>F</u> GAGAA	15	AA	14	AG <u>K</u> A
1020,5473	1020,5473	0,0	AK <u>F</u> GAGAA	15	LNL	14	AG <u>K</u> A
1031,5161	1031,5156	0,5	<u>K</u> FGAGAA	15	AA	15,17,19,21,23,27,29,31	AA <u>K</u> A



**Abb. A. 17: CID-Spektrum des linearen Peptides LGPGVKPA aus bovinem Aortenelastin**  
b-Ionen und y-Ionen sind blau bzw. rot dargestellt. Gleiches gilt für damit verwandte Ionen (interne Fragmente,  $H_2O$ -,  $NH_3$ -Abspaltungen). Das entsprechende Vorläuferion befand sich bei  $m/z$  369,7295;  $z = 2$ .

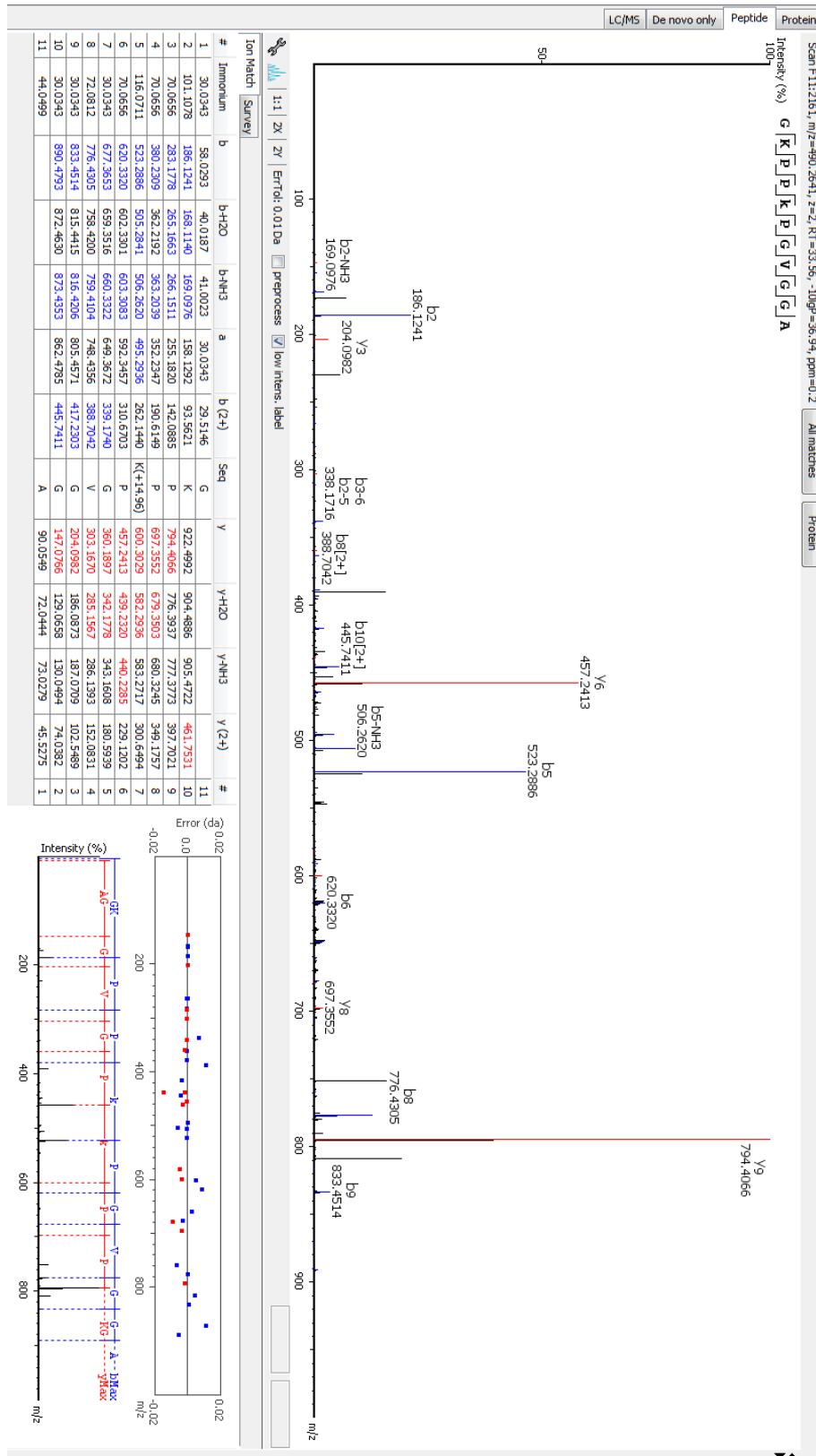
# Anhang



**Abb. A. 18: Falsch identifiziertes Peptid GKP-Hyp-Lya-PGVGGA aus Elastin von XTR**

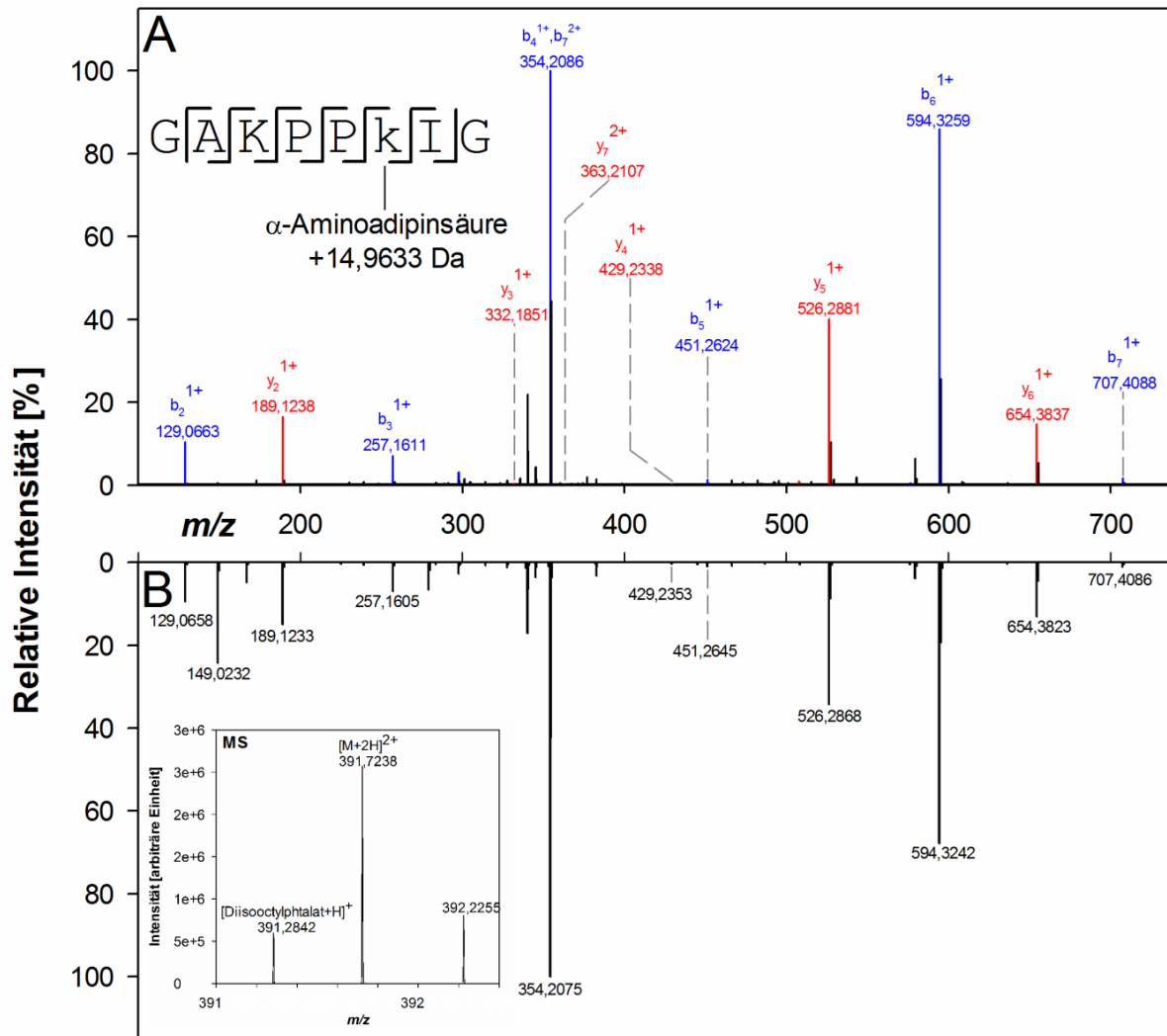
Abgebildet ist ein Ausschnitt von dem Interface aus PEAKS 7.5 mit dem annotierten CID-Spektrum des Peptids  $m/z$  490,2641;  $z = 2$ . Die Suchparameter berücksichtigen Deamidierung, Allysin und Hydroxyprolin.

# Anhang



**Abb. A. 19: Korrekt identifiziertes Peptid GKPP-Aad-PGVGGA aus Elastin von XTR**

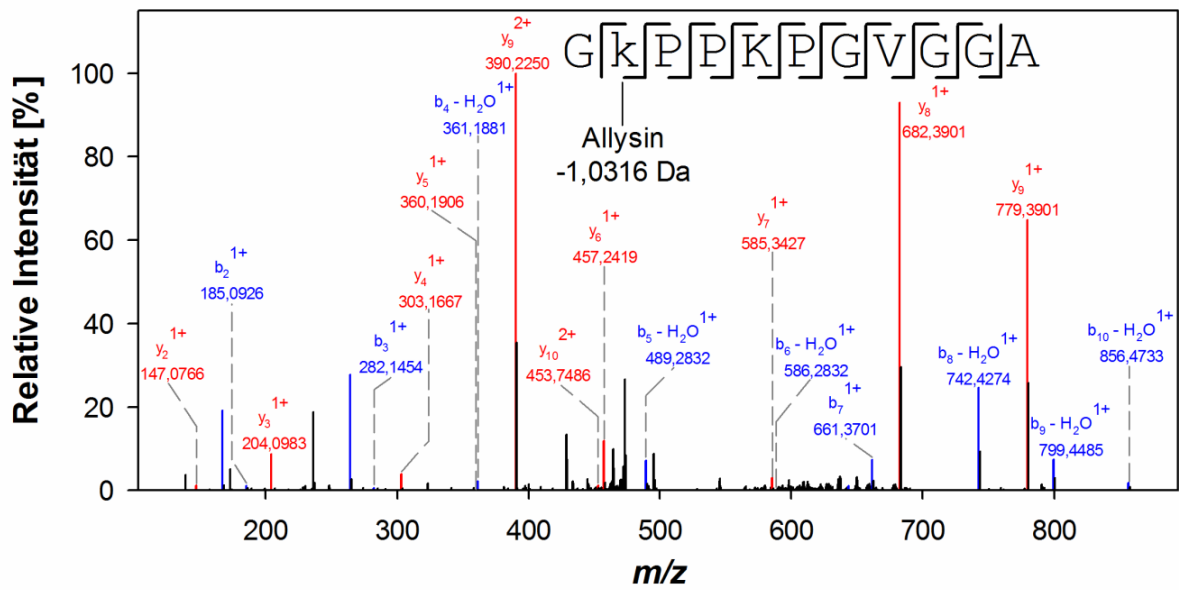
Abgebildet ist ein Ausschnitt von dem Interface aus PEAKS 7.5 mit dem annotierten CID-Spektrum des Peptides  $m/z$  490,2641;  $z = 2$ . Die Suchparameter berücksichtigten Deamidierung, Allysin, Hydroxyprolin und  $\alpha$ -Aminoadipinsäure.



**Abb. A. 20: CID-Spektren bei 35 % NE des Peptides GAKPP-Aad-IG identifiziert in Elastin von XTR sowie des synthetisierten Peptides GAKPP-Aad-IG**

[A] Fragmentationenspektrum des Peptides GAKPP-Aad-IG aus XTR-Elastin. b-Ionen und y-Ionen sind blau bzw. rot dargestellt. Gleiches gilt für damit verwandte Ionen (interne Fragmente,  $H_2O$ -,  $NH_3$ -Verluste). Das Vorläuferion war bei  $m/z$  391,7239;  $z = 2$ . [B] zeigt das Fragmentationenspektrum des synthetisierten Peptides GAKPP-Aad-IG. Das Vorläuferion befand sich bei  $m/z$  391,7238;  $z = 2$ . Weiterhin ist als Einschub das Vorläuferionenspektrum mit dem Peptid bei  $m/z$  391,7238 sowie dem mit ausgewählten Vorläuferion bei  $m/z$  391,2842;  $z=1$  zu sehen. Dabei handelt es sich um protoniertes Diisooctylphthalat.

A



B

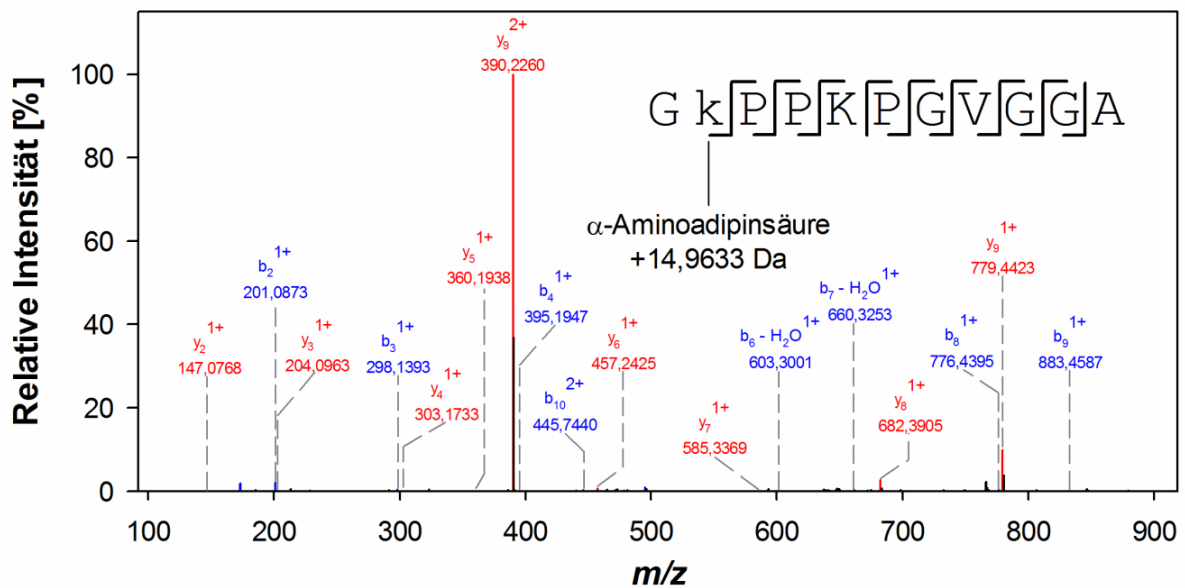
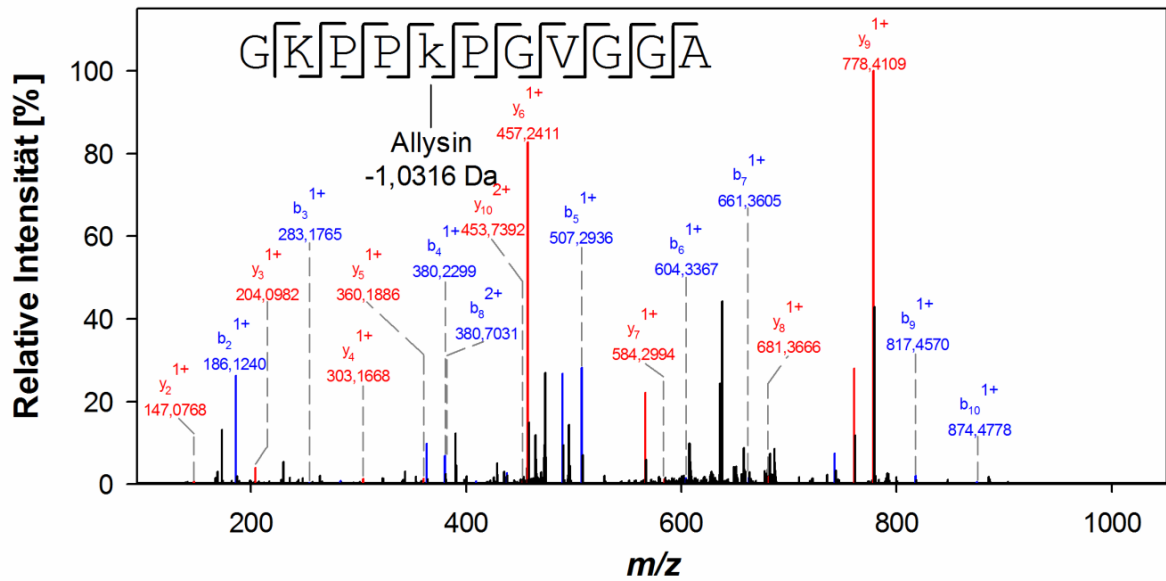


Abb. A. 21: CID-Spektren der linearen Peptide G-Lya-PPKPGVGGGA und G-Aad-PPKPGVGGGA aus Lungenelastin von *XTR*

b-Ionen und y-Ionen sind blau bzw. rot dargestellt. Gleiches gilt für damit verwandte Ionen (interne Fragmente,  $H_2O$ -,  $NH_3$ -Verluste). Die entsprechende Vorläuferionen befanden sich bei [A]  $m/z$  482,2666;  $z = 2$  und [B]  $m/z$  490,2640;  $z = 2$ .



A



B

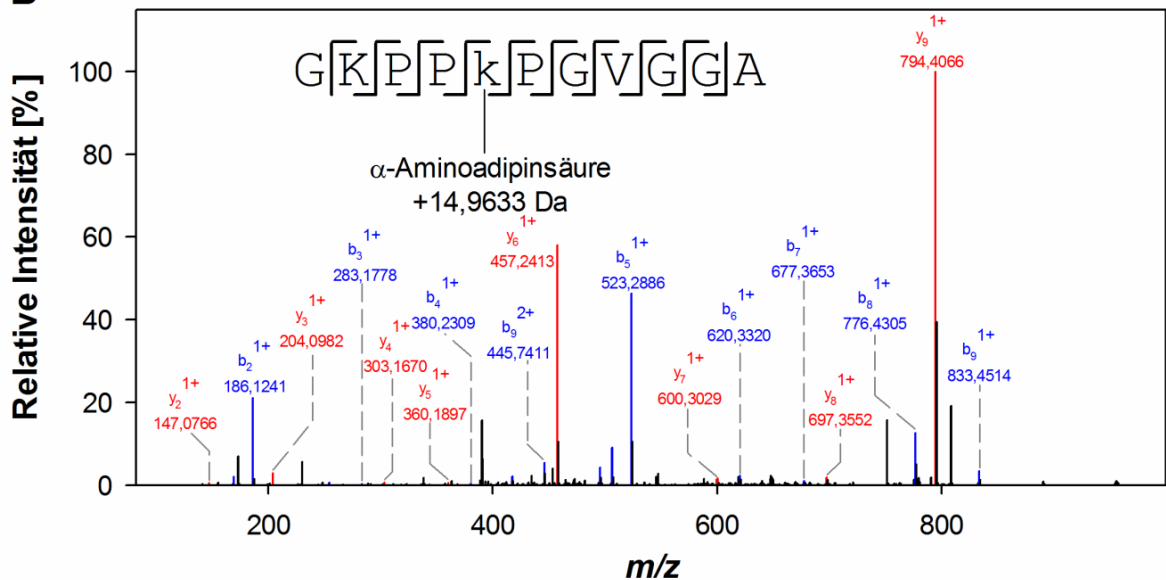


Abb. A. 22: CID-Spektren der linearen Peptide GKPP-Lya-PGVGGA und GKPP-Aad-PGVGGA aus Lungenelastin von *XTR*

b-Ionen und y-Ionen sind blau bzw. rot dargestellt. Gleiches gilt für damit verwandte Ionen (interne Fragmente,  $H_2O$ -,  $NH_3$ -Verluste). Die entsprechende Vorläuferionen befanden sich bei [A]  $m/z$  482,2665;  $z = 2$  und [B]  $m/z$  490,2642;  $z = 2$ .

## Anhang

**Tab. A. 9: Lineare Peptide mit posttranslational modifizierten Lysinresten aus XTR**

KP-Domänen sind blau und KA-Domänen sind rot dargestellt. Neben dem berechneten  $m/z$ -Wert des einfach geladenen Vorläuferions ist zur besseren Übersichtlichkeit der gemessene Wert einschließlich des relativen Massenfehlers angegeben. Alle ausgewählten Vorläuferionen mit Ausnahme des dreifach geladenen G-Aad-PPKPGYGPR-Peptides waren zweifach geladen. Die zusätzliche Ladung rührte dort von dem positiv geladenen Arginin am C-Terminus.

$[M+H]^+$ beobachtet	$[M+H]^+$ berechnet	$\Delta m$ [ppm]	Peptid	Domäne
1012,5101	1012,5098	0,3	YPGG-Aad-PPKPG	4, 25, 27, 29, 31, 41, 43, 45, 47
979,5211	979,5207	0,4	GKPP-Aad-PGVGGA	4
963,5257	963,5258	-0,1	GKPP-Lya-PGVGGA	4
963,5259	963,5258	0,2	G-Lya-PPKPGVGGGA	4
979,5207	979,5207	0,2	G-Aad-PPKPGVGGGA	4
835,4669	835,4672	-0,3	GKPP-Lya-PGVG	4
851,4621	851,4621	0,0	GKPP-Aad-PGVG	4
1336,6751	1336,6743	0,6	AAG-Aad-PG-Aad-LPGAGI-Hyp-G	9
1321,7119	1321,7110	0,7	AAGKPG-Aad-LPGAGI-Hyp-G	9
910,4993	910,4992	0,2	AAGKPG-Aad-LPG	9
782,4405	782,4406	-0,1	GLGA-Aad-PPK	20
1050,5947	1050,5942	0,6	GAKPP-Lya-IGGVGA	20
1066,5899	1066,5891	0,8	GAKPP-Aad-IGGVGA	20
922,5359	922,5356	0,3	GAKPP-Lya-IGGV	20
766,4457	766,4457	0,0	GAKPP-Lya-IG	20
823,4671	823,4672	-0,1	GAKPP-Lya-IGG	20
782,4405	782,4406	-0,1	GAKPP-Aad-IG	20
839,4619	839,4621	-0,3	GAKPP-Aad-IGG	20
1009,5683	1009,5677	0,6	AKPP-Aad-IGGVGA	20
810,4715	810,4720	-0,5	KPP-Aad-IGGV	20
794,4769	794,4770	-0,1	KPP-Lya-IGGV	20
1154,5845	1154,5840	0,5	AY-Hyp-AGG-Lya-PPKPG	23
986,4945	986,4941	0,5	AGG-Aad-PPKPGY	23, 33, 35, 37, 39, 49, 51
915,4573	915,4570	0,3	GG-Aad-PPKPGY	23, 25, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51
972,4791	972,4785	0,7	GGKPP-Aad-PGYG	23, 25, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51
1182,6147	1182,6153	-0,5	GLYPGG-Aad-PPKPG	25, 41, 43, 45, 47

## Anhang

1166,6209	1166,6203	0,6	GLYPGG-Lya-PPKPG	25, 41, 43, 45, 47
1197,5799	1197,5786	1,2	GLYPGG-Aad-PP-Aad-PG	25, 41, 43, 45, 47
1125,5957	1125,5938	1,6	LYPGG-Aad-PPKPG	25, 41, 43, 45, 47
1399,6849	1399,6852	-0,1	TGAGTYPGG-Aad-PPKPG	27
1298,6385	1298,6375	0,8	GAGTYPGG-Aad-PPKPG	27
1170,5799	1170,5790	0,8	GTYPGG-Aad-PPKPG	27
1154,5849	1154,5840	0,9	GTYPGG-Lya-PPKPG	27
1185,5433	1185,5422	0,9	GTYPGG-Aad-PP-Aad-PG	27
1453,7699	1453,7685	1,0	GTYPGG-Aad-PPKPGLGI	27
1113,5581	1113,5575	0,5	TYPGG-Aad-PPKPG	27
865,4777	865,4778	0,0	GKPP-Aad-PGLG	27
808,4561	808,4563	-0,2	GKPP-Aad-PGL	27
978,5621	978,5618	0,4	G-Aad-PPKPGLGI	27
849,4827	849,4828	-0,1	GKPP-Lya-PGLG	27
792,4611	792,4614	-0,3	GKPP-Lya-PGL	27
1213,5853	1213,5847	0,6	GGAY-Hyp-GG-Aad-PPKPG	29
1156,5639	1156,5633	0,5	GAY-Hyp-GG-Aad-PPKPG	29, 31
1140,5689	1140,5683	0,5	GAYPGG-Aad-PPKPG	29, 31
1155,5323	1155,5316	0,7	GAYPGG-Aad-PP-Aad-PG	29, 31
1124,5739	1124,5735	0,4	GAYPGG-Lya-PPKPG	29, 31
1140,5689	1140,5683	0,6	GAY-Hyp-GG-Lya-PPKPG	29, 31
1083,5477	1083,5469	0,8	AYPGG-Aad-PPKPG	29, 31
1099,5427	1099,5418	0,8	AY-Hyp-GG-Aad-PPKPG	29, 31
1067,5527	1067,5520	0,8	AYPGG-Lya-PPKPG	29, 31
1227,6007	1227,6004	0,3	AY-Hyp-GGKPP-Aad-PGAG	29, 31
1083,5473	1083,5469	0,5	AY-Hyp-GG-LYA-PPKPG,A	29, 31
1211,6063	1211,6054	0,7	AYPGGK-Hyp-P-LYA-PGAG	29, 31
1098,5107	1098,5102	0,5	AYPGG-Aad-PP-Aad-PG	29, 31
1189,6585	1189,6574	1,0	GKPP-Aad-PGAGLVPG	29
1189,6589	1189,6574	1,2	G-Aad-PPKPGAGLVPG	29
936,5149	936,5149	0,1	GKPP-Aad-PGAGL	29
1069,5317	1069,5312	0,4	GKPP-Aad-PGYGPG	31, 35, 37, 41, 45, 47
1181,5953	1181,5949	0,4	G-Lya-PPKPGYGPAG	31, 35, 37, 41, 45, 47

## Anhang

---

1140,5693	1140,5683	0,8	GKPP-Aad-PGYGPGA	31, 35, 37, 41, 45, 47
1197,5907	1197,5898	0,8	G-Aad-PPKPGYGPAG	31, 35, 37, 41, 45, 47
1438,7335	1438,7324	0,8	AGGLYPGAGG-Aad-PPKPG	33, 35, 37, 39, 49
1453,6971	1453,6958	0,9	AGGLYPGAGG-Aad-PP-Aad-PG	33, 35, 37, 39, 49
1294,6809	1294,6789	1,5	GLYPGAGGKPP-Lya-PG	33, 35, 37, 39, 49, 51
1253,6535	1253,6524	0,9	LYPGAGG-Aad-PPKPG	33, 35, 37, 39, 49, 51
1325,6495	1325,6484	0,8	AGG-Aad-PPKPGYGPAG	35, 37
1268,6275	1268,6269	0,6	AGG-Aad-PPKPGYGPGA	35, 37
1239,6375	1239,6368	0,7	GGLYPGG-Aad-PPKPG	41, 43, 45, 47
1168,6109	1168,6109	0,0	G-Aad-PPKPGYGPR	43

---

## Anhang

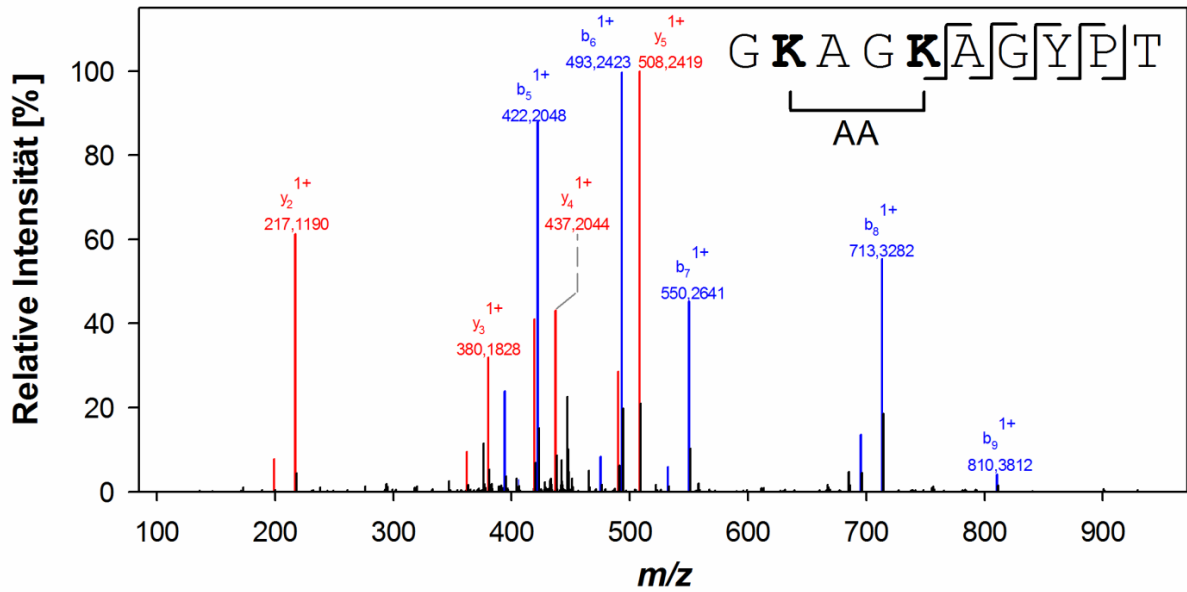
**Tab. A. 10: Intrapeptidal bifunktional quervernetzte Peptide aus XTR**

Lysinreste, die in die Quervernetzung eingebunden sind, sind unterstrichen. KP-Domänen sind blau und KA-Domänen sind rot dargestellt. Neben dem berechneten  $m/z$ -Wert des einfach geladenen Vorläuferions ist zur besseren Übersichtlichkeit der gemessene Wert einschließlich des relativen Massenfehlers angegeben. Alle ausgewählten Vorläuferionen waren zweifach geladen.

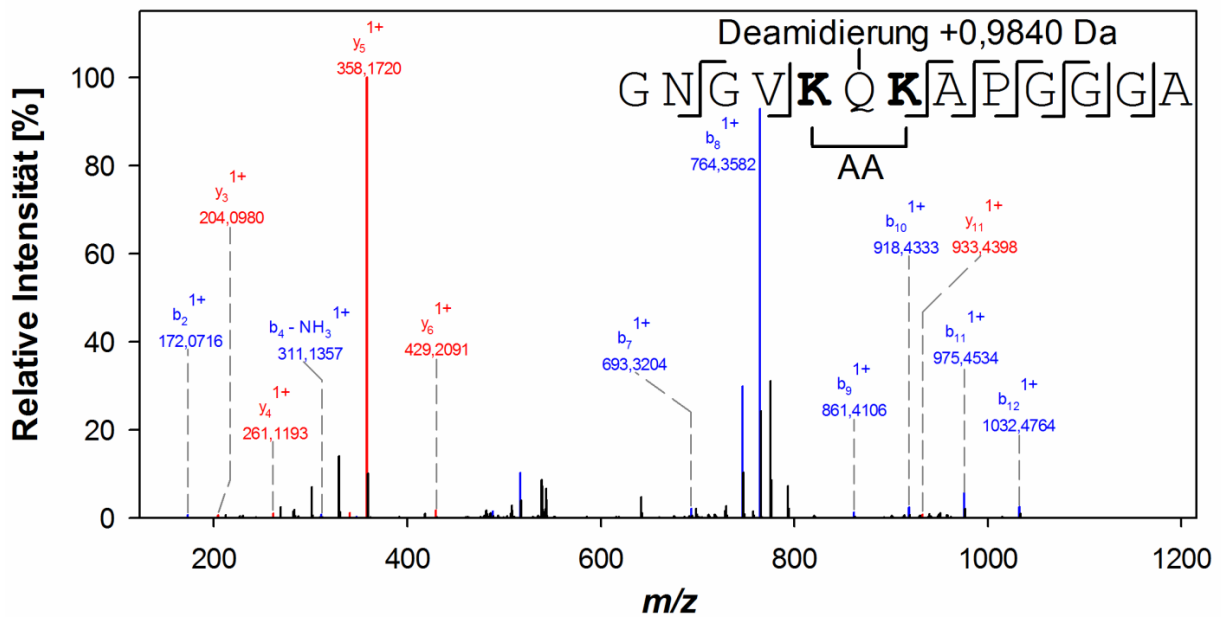
$[M+H]^+$ beobachtet	$[M+H]^+$ berechnet	$\Delta m$ [ppm]	Peptid	Domäne	Typ
1289,6535	1289,6523	1,0	GVYPGG <u>K</u> PP <u>K</u> PGVG	4	AA
1417,7119	1417,7109	0,7	GVYPGG <u>K</u> PP <u>K</u> PGVGGA	4	AA
1360,6895	1360,6894	0,2	VYPGG <u>K</u> PP <u>K</u> PGVGGA	4	AA
947,5307	947,5308	0,0	G <u>K</u> PP <u>K</u> PGVGGA	4	LNL
949,5465	949,5465	0,2	AAG <u>K</u> PG <u>K</u> LPGA	9	LNL
878,5095	878,5094	0,2	AAG <u>K</u> PG <u>K</u> LPG	9	LNL
1121,5231	1121,5221	1,0	GNGV <u>K</u> Q(+0,98) <u>K</u> APGGGA	11	AA
1128,5327	1128,5320	0,7	GAAG <u>K</u> AG <u>K</u> AGYPT	15	AA
1000,4737	1000,4733	0,5	AG <u>K</u> AG <u>K</u> AGYPT	15	AA
929,4363	929,4362	0,2	G <u>K</u> AG <u>K</u> AGYPT	15	AA
1073,5993	1073,5989	0,4	GLG <u>A</u> KPP <u>K</u> IIGGV	20	AA
1034,5997	1034,5992	0,4	G <u>A</u> KPP <u>K</u> IIGVGA	20	LNL
906,5409	906,5406	0,3	G <u>A</u> KPP <u>K</u> IIGGV	20	LNL
906,5397	906,5406	-1,0	<u>K</u> PP <u>K</u> IIGVGA	20	LNL
1011,5259	1011,5257	0,3	AGG <u>K</u> PP <u>K</u> PGYG	23, 33, 35, 37, 39, 49, 51	LNL
954,5045	954,5042	0,3	AGG <u>K</u> PP <u>K</u> PGY	23, 33, 35, 37, 39, 49, 51	LNL
1082,5635	1082,5628	0,7	AGG <u>K</u> PP <u>K</u> PGYGA	23, 49	LNL
1310,6429	1310,6415	1,1	GLYPGG <u>K</u> PP <u>K</u> PGY	25, 41, 43, 45, 47,	AA
1647,8403	1647,8376	1,6	TGAGTYPGG <u>K</u> PP <u>K</u> PGLGI	27	AA
1534,7555	1534,7535	1,3	TGAGTYPGG <u>K</u> PP <u>K</u> PGLG	27	AA
1546,7915	1546,7899	1,0	GAGTYPGG <u>K</u> PP <u>K</u> PGLGI	27	AA
1433,7069	1433,7059	0,7	GAGTYPGG <u>K</u> PP <u>K</u> PGLG	27	AA
1418,7321	1418,7313	0,6	GTYPGG <u>K</u> PP <u>K</u> PGLGI	27	AA
1248,6269	1248,6258	1,0	GTYPGG <u>K</u> PP <u>K</u> PGL	27	AA
1645,8597	1645,8584	0,8	GTYPGG <u>K</u> PP <u>K</u> PGLGIGL	27	AA
1305,6485	1305,6473	0,9	GTYPGG <u>K</u> PP <u>K</u> PGLG	27	AA
1475,7545	1475,7528	1,1	GTYPGG <u>K</u> PP <u>K</u> PGLGIG	27	AA
1136,5741	1136,5744	-0,2	GTYPGG <u>K</u> PG <u>K</u> PG	27	$\Delta$ -LNL
1170,6529	1170,6516	1,1	G <u>K</u> PP <u>K</u> PGLGIGGL	27	AA

Anhang

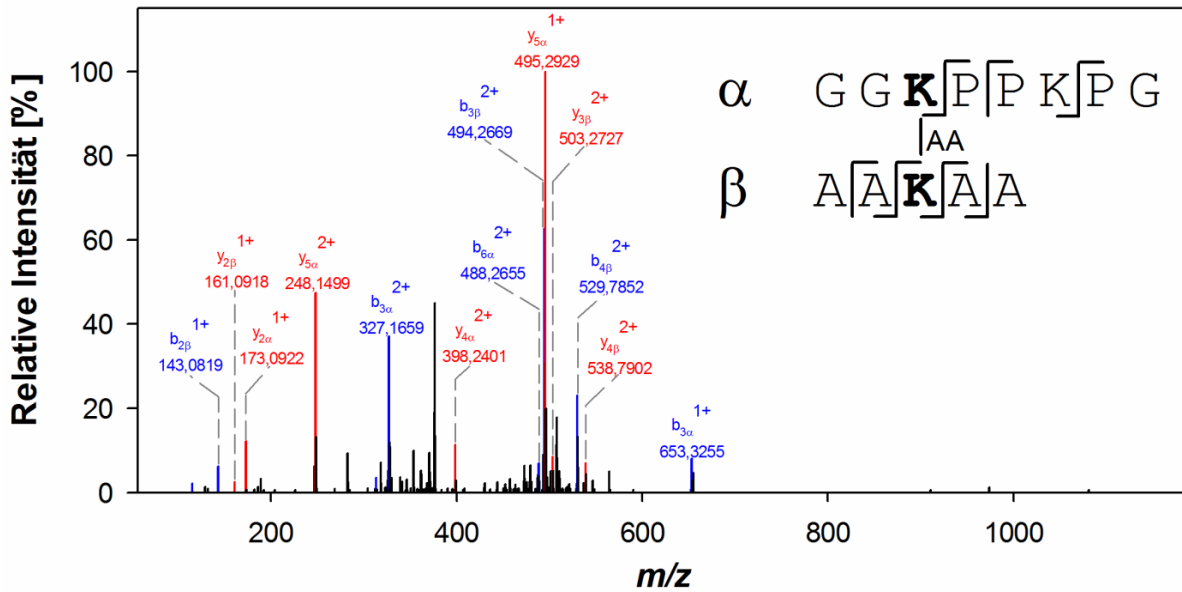
1814,9083	1814,9071	0,7	AAGGAY-Hyp-GGK <u>PPK</u> PGAGLVPG	29	AA
1672,8335	1672,8329	0,4	GGAY-Hyp-GGK <u>PPK</u> PGAGLVPG	29	AA
1195,6115	1195,6104	0,9	AY-Hyp-GGK <u>PPK</u> PGAG	29	LNL
1542,7965	1542,7950	0,9	AYPGGK <u>PPK</u> PGAGLVPG	29	AA
1558,7909	1558,7899	0,7	AY-Hyp-GGK <u>PPK</u> PGAGLVPG	29	AA
1049,5421	1049,5425	-0,3	AYPGGK <u>PK</u> PG	29	Δ-LNL
904,5247	904,5250	-0,2	G <u>KPPK</u> PGAGL	29	LNL
1623,7467	1623,7436	1,9	GAY-Hyp-GGK <u>PPK</u> PGYGPGAG	31	AA
1550,7285	1550,7273	0,9	AYPGGK <u>PPK</u> PGYGPGAG	31	AA
1165,6011	1165,6000	1,0	G <u>KPPK</u> PGYGPGAG	31, 41, 45	LNL
1460,7185	1460,7168	1,2	GAGGLYPGAGGK <u>PPK</u> PG	33, 35, 37, 39, 49	AA
1406,7435	1406,7425	0,8	AGGLYPGAGGK <u>PPK</u> PG	33, 35, 37, 39, 49	LNL
1403,6965	1403,6953	0,9	AGGLYPGAGGK <u>PPK</u> PG	33, 35, 37, 39, 49	AA
1335,7061	1335,7054	0,5	GGLYPGAGGK <u>PPK</u> PG	33, 35, 37, 39, 49	LNL
1332,6601	1332,6582	1,5	GGLYPGAGGK <u>PPK</u> PG	33, 35, 37, 39, 49	AA
1275,6377	1275,6367	0,8	GLYPGAGGK <u>PPK</u> PG	33, 35, 37, 39, 49, 51	AA
1221,6633	1221,6626	0,7	LYPGAGGK <u>PPK</u> PG	33, 35, 37, 39, 49, 51	LNL
1218,6159	1218,6152	0,7	LYPGAGGK <u>PPK</u> PG	33, 35, 37, 39, 49, 51	AA
1962,9357	1962,9343	0,7	GAGGLYPGAGGK <u>PPK</u> PGYGPGAG	35, 37	AA
1720,8337	1720,8329	0,6	LYPGAGGK <u>PPK</u> PGYGPGAG	35, 37	AA
1236,6381	1236,6371	0,9	AGGK <u>PPK</u> PGYGPGA	35, 37	LNL
1293,6595	1293,6585	0,8	AGGK <u>PPK</u> PGYGPGAG	35, 37	LNL
1290,6125	1290,6112	1,0	AGGK <u>PPK</u> PGYGPGAG	35, 37	AA
1630,8245	1630,8222	1,4	GIGAGGLYPGAGGK <u>PPK</u> PG	39, 49	AA
1834,8765	1834,8757	0,5	GAGGLYPGGK <u>PPK</u> PGYGPGAG	41, 45, 47	AA
1578,7609	1578,7586	1,5	GGLYPGGK <u>PPK</u> PGYGPG	41, 45, 47	AA
1521,7391	1521,7372	1,3	GGLYPGGK <u>PPK</u> PGYGP	41, 43, 45, 47	AA
1706,8187	1706,8172	0,9	GGLYPGGK <u>PPK</u> PGYGPGAG	41, 45, 47	AA
1367,6649	1367,6629	1,4	GGLYPGGK <u>PPK</u> PGY	41, 43, 45, 47	AA
1521,7387	1521,7372	1,1	GLYPGGK <u>PPK</u> PGYGPG	41, 45, 47	AA
1677,8397	1677,8382	0,9	GGLYPGGK <u>PPK</u> PGYGPR	43	AA
1819,9029	1819,9012	1,0	GGLYPGGK <u>PPK</u> PGYGPGAGL	47	AA
1977,9717	1977,9704	0,7	GGLYPGGK <u>PPK</u> PGYGPGAGLGT	47	AA
1433,7085	1433,7059	1,9	G <u>KPPK</u> PGYGPGAGLGT	47	AA



**Abb. A. 23: CID-Spektrum des durch AA intrapeptidal quervernetzten Peptides GKAGKAGYPT aus Lungenelastin von XTR**  
b-Ionen und y-Ionen sind blau bzw. rot dargestellt. Gleiches gilt für damit verwandte Ionen (interne Fragmente, H<sub>2</sub>O-, NH<sub>3</sub>-Verluste). Das entsprechende Vorläuferion befand sich bei  $m/z$  465,2218;  $z = 2$ .

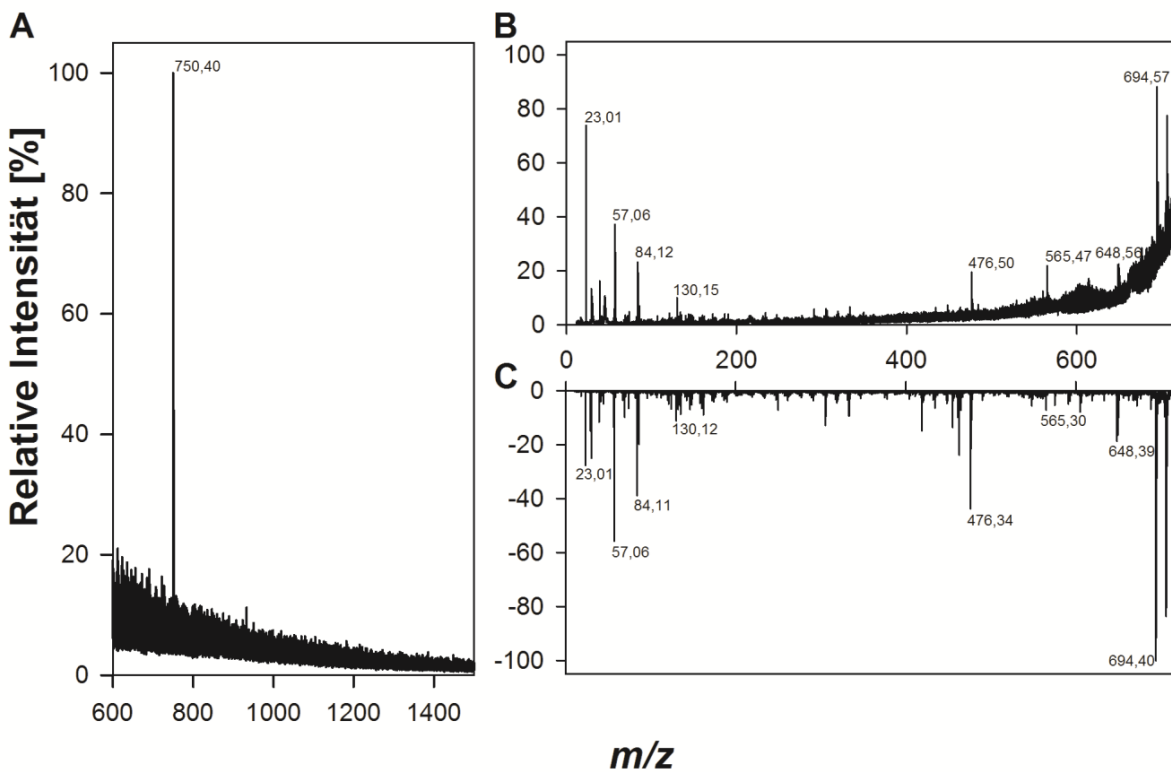


**Abb. A. 24: CID-Spektrum des durch AA intrapeptidal quervernetzten Peptides GNGVKEKAPGGGA aus Lungenelastin von XTR**  
b-Ionen und y-Ionen sind blau bzw. rot dargestellt. Gleiches gilt für damit verwandte Ionen (interne Fragmente, H<sub>2</sub>O-, NH<sub>3</sub>-Verluste). Das entsprechende Vorläuferion befand sich bei  $m/z$  561,2652;  $z = 2$ .



**Abb. A. 25: CID-Spektrum des durch AA interpeptidal quervernetzten Peptides GGKPPKPG-AAKAA aus Lungenelastin von XTR**

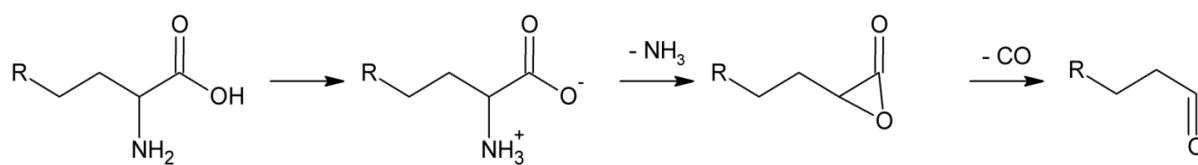
b-Ionen und y-Ionen sind blau bzw. rot dargestellt. Gleiches gilt für damit verwandte Ionen (interne Fragmente, H<sub>2</sub>O-, NH<sub>3</sub>-Verluste). Das entsprechende Vorläuferion befand sich bei  $m/z$  383,2081;  $z = 3$ .



**Abb. A. 26: Vorläufer- und Fragmentationenspektren von totalhydrolysiertem und nachfolgend propionyliertem Elastin aus XTR in Vergleich mit dem Fragmentationenspektrum eines propionylierten DES-Standards mittels MALDI-TOF/TOF MS**

[A] zeigt das Vorläuferionenspektrum von totalhydrolysiertem, propionyliertem Elastin aus XTR. [B] zeigt das Fragmentationenspektrum von totalhydrolysiertem, propionyliertem Elastin aus XTR ( $m/z$  750,40;  $z=1$ ) und [C] das Fragmentationenspektrum eines propionyliertem DES-Standards ( $m/z$  750,39;  $z=1$ ).





**Abb. A. 27: Dissoziationsmechanismus des Neutralverlustes von CO und NH<sub>3</sub> aus den Alkylketten von DES/IDES im Zuge der Fragmentation durch CID**

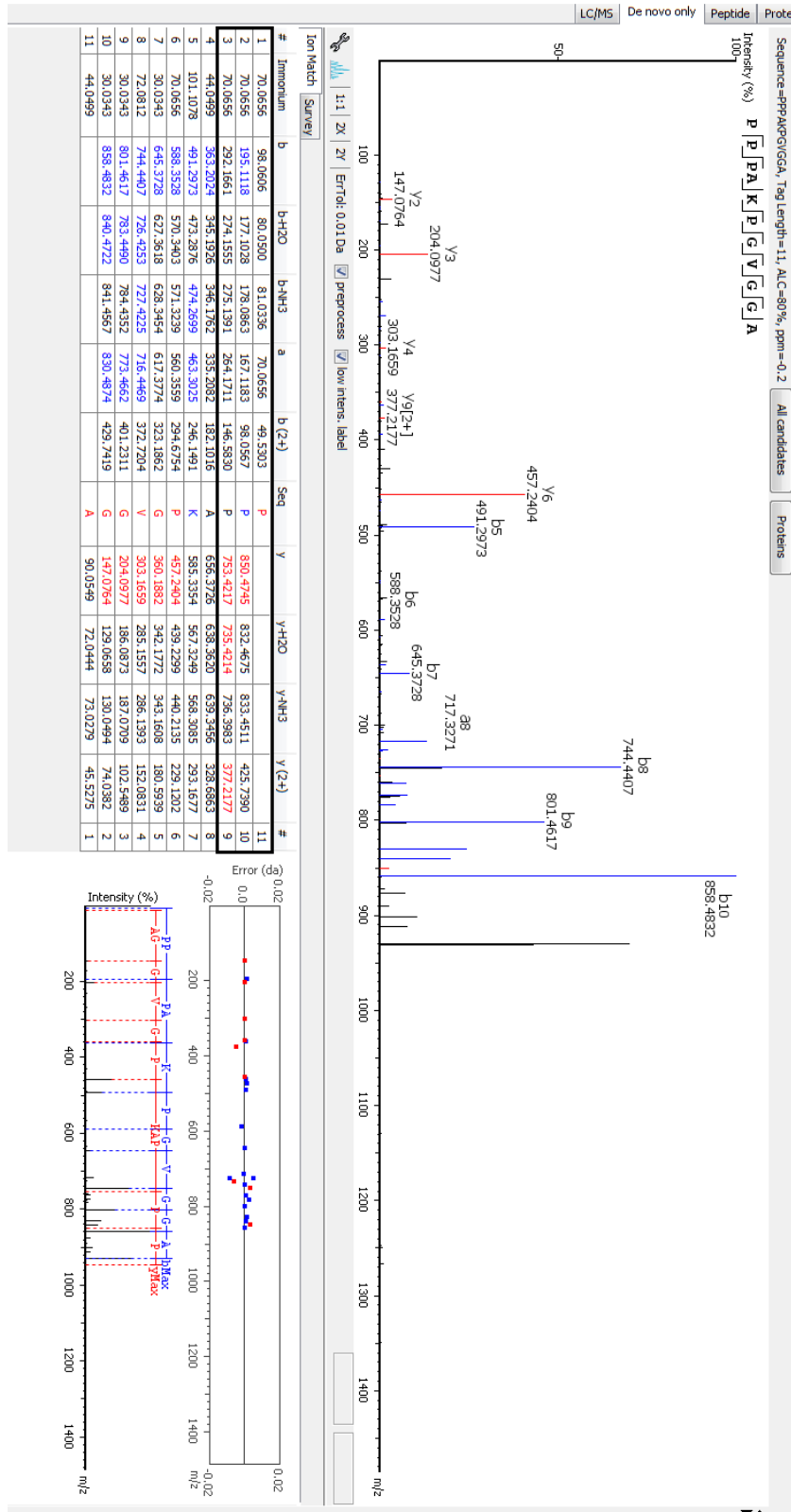


Abb. A. 28: Falsch identifiziertes Peptid PPAKPGVGGGA aus Elastin von XTR

Abgebildet ist ein Ausschnitt von der graphischen Benutzeroberfläche von PEAKS 7.5 mit dem annotierten CID-Spektrum des Peptides  $m/z$  474,2690;  $z = 2$ . Die Suchparameter berücksichtigten Deamidierung, Allysin und Hydroxyprolin. Bei dem korrekt identifizierten Peptid handelt es sich um das durch LNL intrapeptidal quervernetzte GKPPKPGVGGGA.

## Lebenslauf

### ■ Persönliche Daten

Name	Christoph Schröder
Geburtsort / -datum	Georgsmarienhütte, 01.07.1988
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	Ledig

### ■ Schulische Ausbildung

1994-1998	Grundschule Michaelisschule in Georgsmarienhütte
1998-2000	Orientierungsstufe Dom in Osnabrück
2000-2007	Gymnasium Ursulaschule in Osnabrück
2007	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

### ■ Studium

10/2007-09/2010	Bachelorstudiengang „Biochemie“ an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/2010-10/2012	Masterstudiengang „Biochemie“ an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

### ■ Wissenschaftliche Tätigkeiten

05/2011-08/2011	<b>Wissenschaftliche Hilfskraft</b> in der Arbeitsgruppe „Regulation der Organohalid-Respiration“ (PD Dr. rer. nat. Ute Lechner), Institut für Biologie/Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
-----------------	---

- 08/2012 **Forschungsaufenthalt** in der Arbeitsgruppe „Extracellular Matrix and Cell Dynamics“ (Prof. Dr. Laurent Debelle), Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, Frankreich
- 10/2012-11/2015 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter** als Promotionsstudent in der Arbeitsgruppe „Biopharmazie“ (Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. Reinhard Neubert), Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 01/2013 **Forschungsaufenthalt** in der Arbeitsgruppe „Extracellular Matrix and Cell Dynamics“ (Dr. Stéphanie Baud), Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, Frankreich
- 04/2015-06/2015 **Forschungsaufenthalt** in der Arbeitsgruppe „Biological Mass Spectrometry“ (Dr. Joshua S. Sharp), Complex Carbohydrate Research Center, Athens, GA, USA

■ Im Rahmen der Promotion erhaltene Auszeichnungen und Förderungen

1. Beste Posterpräsentation in der Postersession "Analysis", **7th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Sciences**, Danzig, Polen, 24.-25. Mai, 2013
2. Reisestipendium durch **Boehringer Ingelheim Fonds** zur Durchführung des Forschungsprojektes: „Fast photochemical oxidation of proteins (FPOP) as a structural MS tool to map the binding site of tropoelastin’s C-terminus interacting with integrin  $\alpha_v\beta_3$ “ (April – Juni 2015, Dr. Joshua S. Sharp, Complex Carbohydrate Research Center, Athens, GA, USA)
3. 1. Platz Nachwuchspreis, verliehen auf der **22. Arbeitstagung – Mikromethoden der Proteinbiochemie** und gesponsort von **Thermo Fisher Scientific Inc.**, Dortmund, 29. Juni-01. Juli 2015

## Publikationsliste und Tagungsbeiträge

### Publikationen

1. Heinz, A., Ruttkies, C. K. H., Jahreis, G., **Schröder, C. U.**, Wichapong, K., Sippl, W., Keeley, F. W., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H. (2013) *In vitro* cross-linking of elastin peptides and molecular characterization of the resultant biomaterials. *Biochim Biophys Acta* 1830, 2994-3004
2. Heinz, A., **Schröder, C. U.**, Baud, S., Keeley, F. W., Mithieux, S. M., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H. (2014) Molecular-level characterization of elastin-like constructs and human aortic elastin. *Matrix Biol* 38, 12-21
3. **Schröder, C. U.**, Heinz, A., Majovsky, P. und Schmelzer, C. E. H. (2015) Fingerprinting Desmosine-Containing Elastin Peptides. *J Am Soc Mass Spectrom* 26(5), 762-73
4. **Schröder, C. U.**, Heinz, A., Majovsky, P., Karaman, B., Sippl, W. and Schmelzer, C.E.H. Mature Elastin - a heterogeneously cross-linked biopolymer. *In Vorbereitung*

### Vorträge

1. **Schröder, C.U.**: Seeking polyfunctionally cross-linked elastin peptides, 47. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS)*, Goethe Universität, Frankfurt, Deutschland, 02.-05. März 2014
2. **Schröder C.U.**: Äußerst schwer verdaulich: Massenspektrometrische Untersuchungen am Strukturprotein Elastin, 22. *Arbeitstagung – Mikromethoden in der Proteinbiochemie*, Zeche Zollern, Dortmund, Deutschland, 29. Juni – 01. Juli 2015

**Poster**

1. Heinz, A., Ruttkies, C.K.H., **Schröder, C.U.**, Jahreis, G., Keeley, F.W., Mithieux, S.M., Weiss, A.S., Neubert, R.H.H. und Schmelzer, C.E.H.: Identification of cross-links in elastin-like biomaterials, *7th European Elastin Meeting*, Ghent, Belgien, 01.-04. September 2012
2. **Schröder, C.U.**, Schmelzer, C.E.H., Baud, S., Weiss, A.S., Neubert, R.H.H. und Heinz, A.: Mass spectrometric characterization of a new elastin-like biomaterial, *7th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Sciences*, Danzig, Polen, 24.-25. Mai 2013
3. **Schröder, C.U.**, Schmelzer, C.E.H., Baud, S., Mithieux, S.M., Weiss, A.S., Keeley, F.W., Neubert, R.H.H. und Heinz, A.: Structural characterization of elastin-like biomaterials, *Gordon Research Conference Elastin & Elastic Fibers*, Biddeford, ME, USA, Juli 2013
4. **Schröder, C.U.**, Schmelzer, C.E.H., Neubert, R.H.H. und Heinz, A.: Understanding the fragmentation of elastin peptides cross-linked by desmosine, *26th Meeting of the Israeli Society for Mass Spectrometry*, Weizmann Institute, Rehovot, Israel, 10. Oktober 2013
5. **Schröder, C.U.**, Schmelzer, C.E.H., Hoehenwarter, W., Neubert, R.H.H. und Heinz, A.: Identification and exact sequence determination of cross-linked peptides released from human aortic elastin, *8th European Elastin Meeting*, Toulouse, Frankreich, 03.-06. September 2014
6. **Schröder, C.U.**, Heinz, A. und Schmelzer, C.E.H.: Evaluation of native cross-links in elastin, *48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS)*, Bergische Universität, Wuppertal, Deutschland, 01.-04. März 2015
7. Mora-Huertas, A.C., Schmelzer, C.E.H., **Schröder, C.U.**, Neubert, R.H.H. und Heinz, A.: Seeking marker peptides for tracking age-related changes in elastic tissues, *48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS)*, Bergische Universität, Wuppertal, Deutschland, 01.-04. März 2015
8. **Schröder, C.U.**, Heinz, A., C. Ihling und Schmelzer, C.E.H.: A comprehensive look at the cross-linking pattern of human, bovine and frog elastin, *5th Symposium on Structural Proteomics (SSP)*, Leopoldina, Halle (Saale), Deutschland, 19.-20. November 2015

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich versichere hiermit, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen genutzt und sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, als solche kenntlich gemacht. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen als solche gekennzeichnet. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials, bei der Herstellung des Manuskripts, sowie bei der geistigen Herstellung der vorgelegten Arbeit waren keine anderen Personen beteiligt. Insbesondere wurde weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch haben Dritte von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die vorgelegte Arbeit ist weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt worden. Ich habe keine früheren erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

---

Christoph Schröder

Halle (Saale), den 01.12.2015