

Massenspektrometrische Charakterisierung von Proteinhydrolysaten: Verdaustudien an β-Casein und Strukturuntersuchungen an Elastin

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Dipl.-Ing. (FH) Christian Schmelzer geboren am 17.05.1978 in Wippra

Halle (Saale) 2007

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Dr. h. c. Reinhard H. H. Neubert Prof. Dr. rer. nat. habil. Andrea Sinz Prof. Dr. rer. nat. habil. Michael O. Glocker

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.05.2007

Für Annett

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe Biopharmazie des Instituts für Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Dr. h. c. Reinhard Neubert, dem ich für die interessante Themenstellung und die ständige Diskussionsbereitschaft danken möchte. Durch die Schaffung guter Arbeitsbedingungen und sein in mich gesetztes Vertrauen ermöglichte er es mir, vielfältige Fragestellungen mit großer Freiheit bearbeiten zu können.

Bei Herrn PD Dr. rer. nat. habil. Klaus Raith möchte ich mich für die vielen wertvollen Hinweise und Diskussionen bedanken. Seine kontinuierliche Unterstützung hat wesentlich zum Entstehen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Für die gute Zusammenarbeit in Forschung und Lehre möchte ich meinen Freunden und Kollegen der Arbeitsgruppen Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie, insbesondere Andreas Hünerbein, Sandra Heuschkel, Dr. Hany Farwanah, Dr. Melkamu Getie und Manuela Woigk, meinen Dank aussprechen.

Für gute Kooperationen und konstruktive Diskussionen möchte ich weiterhin Dr. Regina Schöps, Dr. Raik Wolf, Dr. Jürgen Schmidt sowie allen Mitautorinnen und -autoren der im Rahmen meiner Promotion entstandenen Veröffentlichungen danken. Bei Andrea Heinz bedanke ich mich für die vielen hilfreichen Gespräche und das kritische Lesen dieser Arbeit.

Herrn Dieter Reese und seinen Mitarbeitern der feinmechanischen Werkstatt möchte ich vielmals für die exzellente Umsetzung und die kreativen Verbesserungsvorschläge beim Bau diverser Hardware danken.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung danke ich für die im Rahmen des Verbundprojektes "Molekulare Ernährungsforschung" (Projekt-Nr. 0312750A) zur Verfügung gestellten Mittel und dem Land Sachsen-Anhalt für das mir durch die Graduiertenförderung gewährte Stipendium.

Mein besonderer Dank gilt Svetlana, die mich in jeder erdenklichen Weise unterstützt hat und der ich sehr viel abverlangt habe, meiner Tochter Alexandra, die zu oft vergeblich auf mich gewartet hat und meinen Eltern für ihre Unterstützung.

INHALTSVERZEICHNIS

DAN	KSAG	UNG	III
ABK	KÜRZU	NGSVERZEICHNIS	VI
SYN	IBOLV	ERZEICHNIS	VIII
1 EI	NLEIT	UNG	1
2 GI PF	RUNDI ROTEII	AGEN DER MASSENSPEKTROMETRIE IN DER PEPTID- UND NANALYTIK	4
2.1	Ionis	ationstechniken	4
	2.1.1	Elektrosprayionisation	4
		2.1.1.1 Konventionelles Elektrospray	6
		2.1.1.2 Nanoelektrospray	6
	2.1.2	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation	7
2.2	2 Ident	ifikation von Peptiden und Proteinen	8
	2.2.1	Peptide Mass Fingerprinting	8
	2.2.2	Fragmentierungsexperimente mittels Massenspektrometrie	9
		2.2.2.1 Tandem-Massenspektrometrie	10
		2.2.2.2 MALDI-TOF-PSD	11
	2.2.3	Peptidsequenzierung	12
		2.2.3.1 <i>De novo</i> -Sequenzierung	13
		2.2.3.2 Datenbankgestützte Sequenzierung	14
3 VI	ERDAU	ISTUDIEN AN β-CASEIN	16
3.1	l Einle	itung	16
3.2	2 Bioal	tive Peptide	16
3.3	3 Ziels	ellung	18
3.4	4 Erge	onisse und Diskussion	19
	3.4.1	Gastroanaloge Proteolyse von β-Casein (Anhang 9.1: Schmelzer <i>et al.</i> 2004, Anhang 9.2:	
		Schmelzer et al. 2007)	19
		3.4.1.1 Zeitlicher Verlauf	22
		3.4.1.2 Bildung bioaktiver Peptide	22
		3.4.1.3 Spaltstellen des Pepsins	24
		3.4.1.4 Identifikation einer neuen genetischen Variante	25
	3.4.2	Untersuchung proteolytischer Spaltungen mittels Quarzmikrobalance in Echtzeit (Anhang 9	.3:
		Huenerbein et al. 2007)	28
4 ST	RUKT	URUNTERSUCHUNGEN AN ELASTIN	30
4. 1	l Einle	itung und Zielstellung	30
4.2	2 Das e	lastische Fasersystem	31
	4.2.1	Elastin	32
	4.2.2	Mikrofibrillen	32
	4.2.3	Elastogenese	33

	4.	.2.3.1	Das Tropoelastin-Gen	. 33
	4.	.2.3.2	Alternatives Spleißen	. 33
	4.	.2.3.3	Expression und Sekretion von Tropoelastin	. 34
	4.	.2.3.4	Posttranslationale Modifikationen	. 36
	4.	.2.3.5	Koazervation und Quervernetzung von Tropoelastin	37
4.3	Ergebni	isse u	nd Diskussion	. 39
	4.3.1 E	insatz	z komplementärer massenspektrometrischer Techniken zur Analyse der Peptide von	
	rekombinantem Tropoelastin (Anhang 9.4: Getie <i>et al.</i> 2005b)			
	4.3.2 U	ntersu	uchung der Primärstruktur des humanen Hautelastins (Anhang 9.5: Schmelzer et al. 2	005
	u	nd An	hang 9.6: Getie <i>et al.</i> 2005a)	. 41
	4.	.3.2.1	Charakterisierung der Peptide	. 42
	4.	.3.2.2	Identifikation der Prolinhydroxylierungen in humanem Hautelastin	. 43
	4.	.3.2.3	Ergebnisse zur Isoform des Hautelastins	. 45
5 71	SAMME	NFA	SSUNC	18
5 20	Vordow	studio	an an B Casain	. 40
5.1	stmltu	stuute	en an p-casein	. 40
3.2	Struktu	runte	ersuchungen an Elastin	. 47
6 LI	FERATU	R		. 51
7 LE	BENSLA	UF		. 64
8 PU	BLIKAT	TONS	SLISTE	. 66
9 AN VE	HANG: 1	DER	DISSERTATIONSSCHRIFT ZU GRUNDE LIEGENDE CHUNGEN	70
				• 70
9.1	spectron matogr 2	zer, C netric 4 105:	C. E. H., Schöps, R., Ulbrich-Hofmann, R, Neubert, R. H. H., Raith, K. (2004) Mass characterization of peptides derived by peptic cleavage of bovine β -casein. <i>J Chro</i> -55 (1-2): 87-92.	
9.2	Schmelz (2007) F J Chrom	zer, C Peptic natogr	C. E. H., Schöps, R., Reynell, L., Ulbrich-Hofmann, R, Neubert, R. H. H., Raith, K. digestion of β -casein: The time course and the fate of possible bioactive peptides. <i>r A</i> , eingereicht.	
9.3	Huenerb and tryp (1): 72-7	ein, A tic dig 77.	A., Schmelzer, C. E. H., Neubert, R. H. H. (2007) Real-time monitoring of peptic gestions of bovine β -casein using quartz crystal microbalance. <i>Anal Chim Acta</i> 584	
9.4	Getie M spectron elastin. I	I., Sc l netric R <i>apid</i>	hmelzer, C. E. H. , Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. (2005) Complementary mass techniques to achieve complete sequence coverage of recombinant human Tropo- <i>Commun Mass Spectrom</i> , 19 (20): 2989-2993.	
9.5	Schmelz			
	human J Chrom	zer, C skin atogr	C. E. H., Getie, M. Neubert, R. H. H. (2005) Mass spectrometric characterization of elastin peptides produced by proteolytic digestion with pepsin and thermitase. $r A$ 1083 (1-2): 120-126.	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

А	Adenin
ACE	Angiotensin-I-Konversionsenzym (engl. angiotensin-I-converting enzyme)
С	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
CHCA	α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure (engl. α-cyano-4-hydroxycinnamic acid)
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation (engl. collision-induced dissociation)
CN	Casein
CPP	Caseinophosphopeptid
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
EBP	Elastin-bindendes Protein (engl. elastin binding protein)
EC	Enzymkategorie (engl. enzyme category)
ESI	Elektrosprayionisation (engl. electrospray ionization)
FT-ICR	Fourier-Transform-Ionenzyklotronresonanz (engl. Fourier transform-ion
	cyclotron resonance)
G	Guanin
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (engl. high performance liquid chro-
	matography)
HTEL	humanes Tropoelastin
IR	Infrarot
ISD	Zerfall in der Quelle (engl. in-source decay)
kb	"Kilobasenpaare" (1 kb = 1000 Basenpaare)
LASER	Lichtverstärkung durch induzierte Strahlungsemission (engl. light amplifi-
	cation by stimulated emission of radiation)
LC	Flüssigchromatographie (engl. liquid chromatography)
LDI	Laserdesorption/Ionisation
LOX	Lipoxygenase
MAGP	Mikrofibrillen-assoziiertes Glykoprotein
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation (engl. matrix-assisted laser
	desorption/ionization)
mRNA	Boten-RNA (engl. messenger RNA)

MS	Massenspektrometrie, Massenspektrum
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie, Tandem-Massenspektrum (auch MS ²)
MS^n	Mehrfach-Massenspektrometrie, Mehrfach-Massenspektrum
Nano-ESI	Nanoelektrosprayionisation (engl. nanoelectrospray ionization)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PCR-SSCP	PCR mit Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse
	(SSCP – engl. single strand conformation polymorphism)
PFF	engl. peptide fragmentation fingerprinting
PMF	engl. peptide mass fingerprinting
pre-mRNA	Vorläufer-mRNA (engl. precursor mRNA)
PSD	Zerfall nach der Quelle (engl. post-source decay)
PTM	posttranslationale Modifikation
QCM	Quarzmikrobalance (engl. quartz crystal microbalance)
qTOF	Hybrid-Massenanalysator aus Quadrupol und Flugzeitanalysator (TOF)
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RP	Umkehrphase (engl. reversed phase)
Т	Thymin
TOF	Flugzeit (-analysator) (engl. time-of-flight)

A min og äv vo	Dreibuch- Einbuch-		- Monoisotopische	
Ammosaure	stabencode	stabencode	Masse	
Alanin	Ala	А	71,0371	
Arginin	Arg	R	156,1011	
Asparagin	Asn	Ν	114,0429	
Asparaginsäure	Asp	D	115,0269	
Cystein	Cys	С	103,0092	
Glutamin	Gln	Q	128,0586	
Glutaminsäure	Glu	Е	129,0426	
Glycin	Gly	G	57,0215	
Histidin	His	Н	137,0589	
Hydroxyprolin	Нур	_a	113,0477	
Isoleucin	Ile	Ι	113,0841	
Leucin	Leu	L	113,0841	
Lysin	Lys	Κ	128,0950	
Methionin	Met	М	131,0405	
Phenylalanin	Phe	F	147,0684	
Prolin	Pro	Р	97,0528	
Serin	Ser	S	87,0320	
Threonin	Thr	Т	101,0477	
Tryptophan	Trp	W	186,0793	
Tyrosin	Tyr	Y	163,0633	
Valin	Val	V	99.0684	

Drei- und Einbuchstabencodes der Aminosäuren sowie Referenzmassen der Aminosäurereste (Aminosäure - H₂O)

Symbolverzeichnis

E	Energie	[N m; J]
λ	Wellenlänge	[m]
т	Masse Molekülmasse, ~m monoisotopische	[kg] [u]
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis	
pН	pH-Wert, negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumio	nenaktivität
t	Zeit	[s]
v	Geschwindigkeit	[m s ⁻¹]

^a In dieser Arbeit mit "**p**" gekennzeichnet

1 EINLEITUNG

Proteine gehören zu den Grundbausteinen allen uns bekannten Lebens. Sie üben entscheidende Funktionen bei nahezu allen biologischen Vorgängen aus, indem sie beispielsweise als Katalysatoren wirken, Moleküle oder Signale übertragen, Immunität verleihen oder an der Bildung mechanisch stabiler Strukturen beteiligt sind. Proteine sind lineare Makromoleküle ungeheurer Strukturvariabilität, die aus den 22 proteinogenen Aminosäuren, den 20 seit langem bekannten sowie Selenocystein und Pyrrolysin, aufgebaut und durch Peptidbindungen zu Ketten verbunden sind. Diese Aminosäuresequenzen sind in den Genen der DNA festgelegt. Eine Möglichkeit zur Ermittlung der Primärstrukturen von Proteinen liegt somit in der Sequenzierung ihrer Gene.

In den vergangenen Jahrzehnten konnten außerordentliche Fortschritte im Rahmen der Genomforschung erzielt werden, die ihren Höhepunkt im Jahre 2001 in der Veröffentlichung des nahezu vollständig sequenzierten menschlichen Genoms erreichte (Lander et al., 2001). Allerdings konnte auch eine Vielzahl von Erwartungen nicht erfüllt werden, da sich viele Zusammenhänge als wesentlich komplexer erwiesen, als ursprünglich angenommen wurde. So kennt man heute zwar aus den entschlüsselten Genen die theoretischen Sequenzen vieler Proteine, von der Mehrzahl allerdings nicht ihre aus alternativem Spleißen und posttranslationalen Modifikationen resultierenden Isoformen und vor allem nicht ihre Funktionen. Die Regel "ein Gen \rightarrow ein Protein" musste revidiert und durch "ein Gen \rightarrow n Proteine" ersetzt werden, wobei n für den Menschen zum Teil dreistellige Zahlenwerte annehmen kann. So kodieren die ca. 20 000 bis 25 000 Gene des Menschen nach verschiedenen Schätzungen mehrere hunderttausend oder sogar Millionen Proteine (IHGSC, 2004). In Analogie zur Genomik (engl. genomics) hat sich der Forschungszweig der Proteomik (engl. proteomics) herausgebildet, der sich je nach Definition die Erforschung aller Proteine einer Zelle oder eines ganzen Organismus zur Aufgabe macht. Anders als das Genom, die Gesamtheit aller Gene eines Organismus, das man näherungsweise als statisch bezeichnen kann, ist das Proteom hoch dynamisch und unterliegt permanent qualitativen und quantitativen Veränderungen. Könnte man das Proteom einer Zelle vollständig erfassen, entspräche dieses Bild immer nur einer Momentaufnahme. Neben diesem Aspekt ist es vor allem die hohe dynamische Breite der Protein-Expressionslevel, die die Proteomforschung zu einer sehr großen Herausforderung macht.

Um die vielfältigen Eigenschaften der Proteine und die Komplexität ihrer Funktionen verstehen zu können, ist die Untersuchung ihrer Struktur, ihres quantitativen Vorkommens, ihrer posttranslationalen Modifikationen sowie ihrer Wechselwirkungen mit anderen Proteinen oder Stoffen erforderlich. Hierzu kommen mannigfaltige Methoden wie Edman-Sequenzierung, Röntgenbeugungsanalyse, Kernresonanzspektroskopie, die Yeast-Two-Hybrid-Technik und in hohem Maße die Massenspektrometrie zum Einsatz. Letztere hat in den vergangenen beiden Jahrzehnten eine äußerst große Bedeutung in den Biowissenschaften erlangt. Sie ermöglicht es, in Verbindung mit Trennverfahren wie der Gelelektrophorese und der Hochleistungsflüssigchromatographie Proteine auch in komplexen Gemischen zu identifizieren und Untersuchungen an ihren Strukturen vorzunehmen. Die Massenspektrometrie zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit, einen großen dynamischen Bereich und eine gute Automatisierbarkeit aus, weshalb sie ein unverzichtbares Werkzeug in der Proteomik und Systembiologie geworden ist.

In der vorliegenden kumulativen Dissertation wurden zwei Fragestellungen der Proteinanalytik durch Anwendung der zu diesem Zweck entwickelten massenspektrometrischen Verfahren bearbeitet. Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit Proteinen als Bestandteile der Nahrung. Neben ihrer unmittelbaren nutritiven Bedeutung können Nahrungsproteine auch funktionelle und biologische Eigenschaften insbesondere in Gestalt ihrer Abbauprodukte, der Peptide und Aminosäuren, besitzen. In den vergangenen drei Jahrzehnten wurde eine Vielzahl von Peptiden mit verschiedenartigen biologischen Wirkungen nachgewiesen. So wurden beispielsweise Peptide gefunden, die wie Opioide wirken, Komplexe mit Mineralien bilden können, den Stoffwechsel oder Blutdruck beeinflussen oder immunstimulierende Eigenschaften aufweisen. Diese so genannten bioaktiven Peptide wurden in verschiedenen tierischen und pflanzlichen Proteinen, vor allem aber in Proteinen der Milch nachgewiesen. Sie liegen inaktiv innerhalb der Proteinsequenzen vor und können während der Verarbeitung der Nahrungsmittel oder aber durch den proteolytischen Abbau in Magen und Darm freigesetzt werden. Im Rahmen eines Teilprojektes des vom BMBF geförderten Netzwerkprojektes "Molekulare Ernährungsforschung" galt es zu überprüfen, inwiefern bioaktive Peptide bei der gastrointestinalen Digestion von Nahrungsproteinen entstehen können. Dabei lag ein Schwerpunkt auf der ersten Stufe des gastrointestinalen Verdaus, der Hydrolyse im Magen, die durch das Enzym Pepsin katalysiert wird.

Der zweite Teil der Arbeit widmete sich der Untersuchung der Primärstruktur des Faserproteins Elastin. Elastin ist gemeinsam mit anderen Strukturproteinen, wie beispielsweise Kollagen, Bestandteil der extrazellulären Matrix und kommt in den elastischen Fasern vieler Organe vor, unter anderem in der Lunge, der Haut und den Blutgefäßen. Durch eine für dieses Protein einzigartige Vernetzung aus Einheiten des Vorläuferproteins Tropoelastin verleiht es den Organen Elastizität. Dabei ergänzen sich die Eigenschaften des Elastins mit denen des Kollagens, so dass die Gewebe insgesamt dehnbar und reißfest werden. Im Falle des Menschen ist die Elastinsynthese bereits im frühen Kindesalter weitgehend abgeschlossen. Verringerungen der Elastizität des Körpergewebes, die einerseits mit dem Älterwerden einhergehen, andererseits infolge schwerwiegender Erkrankungen auftreten können, sind in der Regel irreversibel. Um die damit im Zusammenhang stehenden degenerativen Veränderungen des Elastins nachvollziehen und geeignete Therapien entwickeln zu können, ist ein genaues Verständnis der auf molekularer Ebene stattfindenden Vorgänge notwendig. Da Elastin jedoch in Wasser, aber auch in organischen Lösungsmitteln vollständig unlöslich ist, ist es für Untersuchungen nur schwer zugänglich und daher im Vergleich zu anderen wichtigen Strukturproteinen wenig untersucht.

Es wurde daher das Ziel verfolgt, mit den Möglichkeiten der Massenspektrometrie Methoden zur Untersuchung der Primärstruktur von humanem Tropoelastin sowie Elastin zu entwickeln. Diese sollten schließlich zur Charakterisierung des Elastins der menschlichen Haut eingesetzt werden.

2 GRUNDLAGEN DER MASSENSPEKTROMETRIE IN DER PEPTIDund Proteinanalytik

Massenspektrometrische Untersuchungen werden an im gasförmigen Zustand vorliegenden ionisierten Analytmolekülen durchgeführt. Es existiert eine Vielzahl apparativer Varianten von Massenspektrometern, denen allen gemein ist, dass sie aus den Grundeinheiten Ionenquelle, Massenanalysator und Detektor bestehen.

Je nach Art der verwendeten Ionenquelle wird die Probe als Gas, Flüssigkeit oder Feststoff zugeführt, wobei sie in den letzten beiden Fällen vor oder während der Ionisierung in die Gasphase überführt wird. Mit dem Massenanalysator werden die Ionen nach ihrem Masse-Ladungs-Quotienten (m/z) aufgetrennt und schließlich am Detektor nachgewiesen.

Für die Analytik von Peptiden und Proteinen haben heute die im Folgenden kurz beschriebenen Ionisationsmethoden Elektrospray (ESI), inklusive der Variante Nanoelektrospray (Nano-ESI), sowie die Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation (MALDI) den wichtigsten Stellenwert eingenommen. Auf Kopplungsmöglichkeiten der Massenspektrometrie mit der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC), weitere Techniken zur Ionisierung und Massenanalyse bzw. die zahlreichen Kombinationsmöglichkeiten soll hier nicht im Detail eingegangen, sondern stattdessen auf weiterführende Literatur [z.B. (Lehmann, 1996; Gross, 2004; Lottspeich und Engels, 2006)] verwiesen werden.

Die Ionisationsarten MALDI und ESI haben Vor- und Nachteile gegenüber der jeweils anderen Technik und führen bei Anwendung auf identische Proben gewöhnlich zu komplementären Ergebnissen (Bodnar *et al.*, 2003; Stapels und Barofsky, 2004).

2.1 Ionisationstechniken

2.1.1 Elektrosprayionisation

Die Elektrosprayionisation wurde ursprünglich Anfang der 1970er Jahre von Dole *et al.* entwickelt (Dole *et al.*, 1968a; Dole *et al.*, 1968b; Mack *et al.*, 1970), schließlich aber erst 1984 von den Arbeitsgruppen um J. Fenn (Nobelpreis für Chemie 2002) (Yamashita und Fenn, 1984a; Yamashita und Fenn, 1984b) und M. Alexandrov (Alexandrov *et al.*, 1984) für die Massenspektrometrie etabliert. Bei dieser Ionisationsart wird die Probe zunächst in einem Lösungsmittel gelöst, das polar und gleichzeitig gut verdampfbar sein sollte und daher meist aus einer Mischung von Wasser und einem organischen Lösungsmittel besteht. Bei Atmosphärendruck wird die Lösung unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes zu einem Nebel feiner und hochgeladener Tröpfchen versprüht. Während das Lösungsmittel verdampft und die Ladungsdichte an der Oberfläche kontinuierlich zunimmt, kommt es aufgrund der starken Abstoßungseffekte zu einem explosionsartigen Zerfall der Tröpfchen (Coulomb-Explosionen). Dieser Vorgang, der durch Kollision mit Inertgasteilchen unterstützt wird, wiederholt sich unter Abnahme der Tröpfchengröße so lange, bis schließlich nur noch desolvatisierte, geladene Moleküle vorliegen, die dann in das eigentliche Massenspektrometer gelangen (Abbildung 1).



Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer Elektrosprayquelle mit pneumatisch unterstütztem Spray.

Typischerweise entstehen je nach Polarität der angelegten Spannung $[M+H]^+$ bzw. $[M-H]^-$ Quasimolekül-Ionen. Charakteristisch für ESI ist weiterhin die Bildung von Addukt-Ionen wie $[M+Na]^+$ oder $[M+NH_4]^+$ sowie das Auftreten von mehrfach geladenen Ionen bei größeren Molekülmassen.

Ein großer Vorteil der Elektrosprayionisation gegenüber anderen Ionisationsarten liegt in der direkten Koppelbarkeit an HPLC-Systeme (LC/ESI-MS), wodurch sich Proben unter Verwendung von entsprechenden Kalibrierstandards quantifizieren lassen. Darüber hinaus eignet sich diese Methode aufgrund ihrer hohen Trennleistung zum Nachweis von Substanzen in biologischen Matrizes wie Arzneistoffen und deren Metaboliten in Körperflüssigkeiten oder aber zur Analyse komplexer Peptid- und Proteingemische. Die Elektrosprayionisation wird in Form kommerzieller Massenspektrometer in Kombination mit nahezu jedem Massenanalysator angeboten. In dieser Arbeit kamen ESI bzw. Nano-ESI in Verbindung mit Quadrupol-Ionenfalle, qTOF (Hybrid-Massenspektrometer aus Quadrupol und Flugzeitanalysator) sowie FT-ICR- (Fourier-Transform-Ionenzyklotronresonanz) Analysator zum Einsatz.

2.1.1.1 Konventionelles Elektrospray

Die Versprühung erfolgt an der Öffnung einer dünnen Kapillare, zumeist aus Fused-Silica oder Stahl bestehend, mit Flussraten im Bereich von 1 μ L min⁻¹ bis 20 μ L min⁻¹, die mittels einer Spritzenpumpe erzeugt werden. Bei direkter Kopplung an konventionelle HPLC-Systeme kommen hingegen deutlich höhere Flussraten bis ca. 300 μ L min⁻¹ zum Einsatz. Bei diesen vergleichsweise hohen Flussraten kommt das so genannte pneumatisch unterstützte Elektrospray zum Einsatz (siehe Abbildung 1). Dabei wird zur Vernebelung der Lösung und zur Unterstützung der Verdampfung des Lösungsmittels ein inertes Gas (in der Regel Stickstoff) verwendet, mit dem die aus der Kapillare austretende Lösung konzentrisch umströmt wird (Bruins *et al.*, 1987).

2.1.1.2 Nanoelektrospray

Bei statischem Nanoelektrospray, das auf Wilm und Mann zurückgeht (Wilm und Mann, 1994), erfolgt die Versprühung aus ausgezogenen Glaskapillaren mit üblichen Öffnungsdurchmessern von 0,7 µm bis 5 µm. Die Flussraten ergeben sich durch das Versprühen der Flüssigkeit im elektrischen Feld und liegen im Bereich von etwa 10 nL min⁻¹ bis 40 nL min⁻¹. Bei Nano-ESI mit online gekoppelter Nano-HPLC wird aus einer Fused-Silica-Kapillare mit einem Öffnungsdurchmesser von ca. 5 µm bis 20 µm und Flussraten von 100 nL min⁻¹ bis 300 nL min⁻¹ versprüht.

Die Nano-ESI-Technik weist gegenüber der konventionellen ESI-Technik eine Reihe von Vorteilen auf. Aus den geringen Flussraten resultiert ein deutlich verminderter Probenbedarf bzw. eine längere zur Verfügung stehende Messzeit je Probe (Wilm und Mann, 1996). Im Falle des statischen Nanoelektrosprays lassen sich beispielsweise mit einem Probenvolumen von 1 µL über eine Stunde Experimente durchführen. Nano-ESI ist jedoch nicht nur einfach eine miniaturisierte Variante der herkömmlichen ESI-Technik, sondern unterscheidet sich von dieser aufgrund des geringeren Flusses und der deutlich kleineren Ausgangströpfchen auch in der Ionenbildung (Karas *et al.*, 2000). Suppressionseffekte und die Empfindlichkeit gegenüber Salzen sind weniger ausgeprägt, wodurch eine chromatographische Vortrennung oftmals nicht notwendig ist (Juraschek *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2003). Zudem lassen sich mit der Nano-ESI sehr gute Nachweisgrenzen bis in den unteren Attomolbereich erreichen, worüber in verschiedenen Arbeiten berichtet wurde (Emmett und Caprioli, 1994; Valaskovic *et al.*, 1995).

2.1.2 Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation

MALDI (engl. matrix-assisted laser desorption/ionization) beruht auf einer auf Karas und Hillenkamp zurückgehenden Erweiterung der Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (LDI-MS) (Karas und Hillenkamp, 1988). Nicht für die Entwicklung des MAL-DI-Verfahrens, sondern für Entdeckungen im Zusammenhang mit der Desorption von Makromolekülen erhielt Koichi Tanaka 2002 den Nobelpreis für Chemie (Tanaka et al., 1988). Bei der MALDI-MS wird ein Analyt zusammen mit einer im 10³- bis 10⁵-fachen molaren Überschuss vorliegenden Matrix auf einen zumeist metallischen Probenträger in flüssiger Form aufgebracht und getrocknet. Im Hochvakuum der Ionenquelle wird die kristalline Oberfläche kurzen Laserpulsen (t < 10 ns bei UV-MALDI) ausgesetzt, deren Energie durch die entsprechende Matrix absorbiert wird. Nach Relaxation im Kristallgitter kommt es zur explosionsartigen Ablösung von Clustern der Kristalloberfläche und zur Ionisation der Analyt-, aber auch der Matrixmoleküle. Im Gegensatz zur ESI entstehen bei MALDI zumeist einfach geladene Molekül-Ionen. Die genauen Vorgänge der Ionisation sind trotz der breiten Anwendung der Technik noch immer nicht vollständig verstanden und Gegenstand kontroverser Diskussionen (Glückmann et al., 2001; Karas und Krüger, 2003; Knochenmuss und Zenobi, 2003).

Die Matrix muss folgende Eigenschaften besitzen bzw. Funktionen erfüllen können:

- (i) eine hohe Energieabsorption bei der eingestrahlten Laserwellenlänge bei gleichzeitigem Schutz der Probe vor photolytischer Zersetzung,
- (ii) die Übertragung der zur Desorption notwendigen Energie und
- (iii) das Bereitstellen bzw. Aufnehmen von Ladungsträgern für die Ionisation der Analytmoleküle.

Es kommen in erster Linie UV-Laser (UV-MALDI, z.B. $\lambda = 337$ nm), seltener auch Infrarot-Laser (IR-MALDI) zur Anwendung. Für die Untersuchung von Proteinen mit UV-MALDI eignen sich als Matrizes 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) und 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (Sinapinsäure), für Peptide zusätzlich α -Cyano-4hydroxyzimtsäure (CHCA).

MALDI-Massenspektrometer werden vor allem mit Flugzeit- (engl. *time-of-flight*, TOF) Massenanalysatoren ausgerüstet, da diese mit einer gepulsten Ionenerzeugung betrieben werden können. Ein weiterer großer Vorteil der TOF-Analysatoren liegt in dem theoretisch unbeschränkten Massenbereich. Praktisch konnten mit MALDI-Massenspektrometern bereits Analyten von über 500 000 u nachgewiesen werden, weshalb sich diese Technik sehr gut zur Proteinmassenbestimmung eignet. Problematisch ist lediglich der *m/z*-Bereich bis ca. 600, der gewöhnlich unterdrückt wird, da in diesem Signale der Matrix stören. Nachteilig gegenüber ESI ist vor allem, dass nicht online an eine chromatographische Vortrennung gekoppelt werden kann, weshalb Quantifizierungen auf diesem Wege nicht durchführbar sind. Man spricht von LC/MALDI-MS, wenn Fraktionen offline analysiert werden, die zuvor mittels HPLC gewonnen wurden.

2.2 Identifikation von Peptiden und Proteinen

2.2.1 Peptide Mass Fingerprinting

Beim *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) werden Proteine mit einer spezifischen Protease wie beispielsweise Trypsin verdaut und anschließend massenspektrometrisch vermessen. Das resultierende Massenspektrum enthält zunächst keine Sequenzdaten, ist jedoch für diese Substrat-Enzym-Kombination einzigartig. Das Spektrum mit den Massen der Peptide wird in eine Peakliste überführt und zur Identifikation an eine Datenbanksuchmaschine gesendet. Diese greift auf Proteinsequenzdatenbanken zu und errechnet unter Berücksichtung der Spaltregeln des Enzyms (engl. *enzyme cleavage rules*) und weiterer Randbedingungen wie Taxonomie, maximale Zahl übersprungener Spaltstellen (engl. *missed cleavages*) etc. die theoretisch entstehenden Peptide des virtuellen Verdaus aller Proteine. Dabei wird die experimentell erhaltene Peakliste mit den errechneten verglichen. Die Ergebnisse werden statistisch ausgewertet und Übereinstimmungen als Resultate ausgegeben. Das *Peptide Mass Fingerprinting* wurde in Verbindung mit der Massenspektrometrie zum ersten Mal im Jahre 1989 (Henzel *et al.*, 1989) vorgestellt. In den frühen 1990er Jahren gab es deutliche Verbesserungen in der Empfindlichkeit und Massengenauigkeit der Mas-

senspektrometer sowie starke Vergrößerungen der Proteindatenbanken, wodurch PMF routinemäßig eingesetzt werden konnte (Henzel *et al.*, 1993; James *et al.*, 1993; Mann *et al.*, 1993; Pappin *et al.*, 1993; Yates *et al.*, 1993). Je nach Massengenauigkeit können Proteine bereits anhand weniger Peptidmassen (drei bis zehn) signifikant identifiziert werden. Allerdings darf die Probe nicht verunreinigt sein, da bereits die Existenz eines einzigen weiteren Proteins den Abgleich erheblich erschweren und eine Identifikation unmöglich machen kann. An Grenzen stößt das Verfahren auch, wenn die gesuchte Proteinsequenz lediglich in Fragmenten in der Datenbank vorliegt. Dies trifft auf einen Großteil der humanen Proteine zu, da deren kodierender Bereich im Genom zwar sequenziert, aber auf viele kleine Exons verteilt ist, deren Lage und Grenzen oft nicht bekannt sind (Reese *et al.*, 2000).

2.2.2 Fragmentierungsexperimente mittels Massenspektrometrie

Fragmentierungsexperimente haben in der Proteinanalytik eine große Bedeutung, da sich mit ihnen Informationen über die Struktur von Molekülen gewinnen lassen. So ist es möglich, aus Fragmentspektren die Sequenzen von Peptiden zu rekonstruieren und die entsprechenden Proteine zu identifizieren, aus denen die Peptide durch Hydrolyse hervorgegangen sind. Dabei nutzt man die Tatsache, dass Fragmentierungen, wie im Schema in Abbildung 2 dargestellt, überwiegend an den Peptidbindungen entlang der Peptidkette auftreten.



Abbildung 2: Schema der Bildung von Fragment-Ionen bei Peptiden am Beispiel eines protonierten Tripeptids [modifiziert nach (Lottspeich und Zorbas, 1998)].

Die Nomenklatur der Fragment-Ionen geht auf Roepstorff und Fohlman sowie Biemann (Roepstorff und Fohlman, 1984; Biemann, 1992) zurück. Fragmente der N-terminalen Serie werden mit a, b und c, die der C-terminalen Serie hingegen mit x, y und z bezeichnet. Ein zusätzlicher Index gibt die Zahl der im jeweiligen Fragment-Ion enthaltenen Aminosäurereste an. Bei bestimmten Fragmentierungsarten, insbesondere bei Nutzung höherer Kollisionsenergien, können zudem Fragmente der Seitenketten der Aminosäuren entstehen. Diese mit d, v und w bezeichneten Fragment-Ionen können wichtige Informationen zur Interpretation der Spektren beitragen und zum Beispiel die Unterscheidung zwischen Leu und Ile ermöglichen.

2.2.2.1 Tandem-Massenspektrometrie

Bei der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS oder MS²) werden bestimmte Molekül-Ionen gezielt zur Fragmentierung angeregt. Die Massenanalyse erfolgt in zwei Stufen. Zunächst werden die Ionen eines zu untersuchenden Analyten nach Isolation im ersten Analysator in einer Kollisionszelle mit Gasteilchen eines Inertgases wie Stickstoff, Argon oder Helium zur Fragmentierung gebracht. Dieser Vorgang wird als stoßinduzierte Fragmentierung bzw. CID (engl. *collision-induced dissociation*) bezeichnet. Die dabei entstehenden leichteren Ionen werden anschließend in der zweiten Stufe massenspektrometrisch analysiert. Diese beiden Analysen können räumlich oder zeitlich getrennt stattfinden.

Bei der räumlichen Tandem-MS (engl. *tandem-in-space*) befinden sich zwei Massenanalysatoren in Serie, wie das beispielsweise bei Triple-Quadrupol-, qTOF- oder TOF-TOF-Geräten der Fall ist. Bei Instrumenten mit Quadrupol-Ionenfallen oder FT-ICR-Analysatoren handelt es sich dagegen um zeitliche Tandem-Massenspektrometrie (engl. *tandem-in-time*), bei der die Analyse der Fragment-Ionen im gleichen Analysator durchgeführt wird. Bei diesen Instrumenten besteht die Möglichkeit, den gesamten Vorgang mehrmals zu wiederholen, so dass bereits erhaltene Fragmente isoliert und weiterfragmentiert werden können. Hierbei spricht man von Mehrfach-Massenspektrometrie oder MSⁿ, wobei n der Anzahl der Fragmentierungsschritte entspricht. Diese Möglichkeit ist besonders dann von Nutzen, wenn im ersten Fragmentierungsschritt nicht genügend aussagekräftige Fragmente entstehen.

Bei Tandem-MS-Experimenten an Peptiden mit ESI-Massenspektrometern treten Fragmentierungen an den Peptidbindungen auf, insbesondere zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dem Amidstickstoff, womit es primär zur Ausbildung von b- und y-Ionen kommt (siehe Abbildung 2).

2.2.2.2 MALDI-TOF-PSD

MALDI gilt ebenso wie ESI als eine "sanfte" Ionisationstechnik, bei der gewöhnlich intakte Quasimolekül-Ionen entstehen. Tatsächlich kommt es jedoch bei MALDI bereits im Verlauf der Ionisation zu Fragmentierungen (prompte Fragmentierung) sowie infolge metastabilen Zerfalls auch während und nach der Beschleunigung der Ionen. Man unterscheidet diese Fragmentierungen nach dem Entstehungsort, das heißt, ob sie in oder nach der Quelle stattfinden. Sie werden daher mit ISD (engl. in-source decay) bzw. PSD (engl. postsource decay) bezeichnet. Die Zusammenhänge um den metastabilen Zerfall von Molekül-Ionen wurden erstmalig von Spengler et al. erkannt und zur Sequenzierung von Peptiden eingesetzt (Spengler et al., 1991; Spengler et al., 1992). In linearen Flugzeitanalysatoren (Lin-TOF) behalten PSD-Fragmente, die in der feldfreien Driftstrecke entstehen, die Geschwindigkeit v der Ausgangs-Molekül-Ionen bei und werden gemeinsam mit diesen detektiert, weswegen sie anhand der Flugzeit nicht vom Vorläufer-Ion unterschieden werden können. Jedes dieser Fragmente verfügt infolge seiner kleineren Masse m auch über eine geringere kinetische Energie $E_{kin} = 0.5 mv^2$. In einem Reflektorflugzeitanalysator (Ref-TOF) lassen sich durch diese Energieunterschiede die Fragmente unter Zuhilfenahme eines statischen elektrischen Bremsfeldes wieder auftrennen und ihren m/z-Werten zuordnen. Um Masseninterferenzen zu vermeiden, müssen zuvor alle stabilen Ionensorten mit Ausnahme der zu untersuchenden unterdrückt werden. Dies wird über ein elektrisches Ablenkfeld - auch als ion gate bezeichnet - realisiert. Die Fragment-Ionen beschreiben je nach ihrer Eindringtiefe in das Bremsfeld verschiedene Flugbahnen, weswegen für eine bestimmte Reflektorspannung immer nur ein begrenzter m/z-Bereich abgedeckt werden kann. Fragment-Ionen mit m/z-Werten außerhalb dieses Bereichs verfehlen die Detektoroberfläche. Bei den meisten MALDI-PSD-Geräten ist es daher erforderlich, unter Variation der Reflektorspannung mehrere Teilspektren (zumeist 10 bis 15) aufzunehmen, die anschließend zu einem Gesamtspektrum zusammengefügt werden. Eine Ausnahme bilden Geräte mit curved field reflectrons, bei denen die Aufzeichnung eines PSD-Spektrums mit einer einzigen Reflektorspannung möglich ist (Cornish und Cotter, 1994; Cordero et al., 1995). In den letzten Jahren wurden zudem kommerzielle MALDI-Massenspektrometer auch mit Hybrid-Analysatoren wie qTOF oder TOF-TOF ausgerüstet, mittels derer sich die dem PSD überlegene Tandem-Massenspektrometrie durchführen lässt.

Bei der Fragmentierung von Peptiden durch PSD kommt es gewöhnlich zur Bildung von a-, b- und y-Fragmenten. Bei höheren Kollisionsenergien, die z.B. durch eine Anhebung der Laserintensität oder die Verwendung eines Kollisionsgases (PSD-CID) induziert werden können, treten zudem Fragmentierungen in den Seitenketten der Aminosäuren auf. Dabei entstehen beispielsweise Immonium-Ionen, die wertvolle Informationen für Sequenzierungen liefern.

Neben PSD-Spektren lassen sich auch ISD-Spektren zur Identifizierung von Peptiden verwenden (Reiber *et al.*, 1998). Darüber hinaus kann ISD auch direkt zur Bestimmung von terminalen Sequenzabschnitten intakter Proteine eingesetzt werden (Suckau und Resemann, 2003).

2.2.3 Peptidsequenzierung

Die klassische Methode zum Sequenzieren von Peptiden und Proteinen ist der Edman-Abbau, bei dem in einem zyklischen Prozess in jedem Reaktionszyklus die N-terminale Aminosäure chemisch derivatisiert, abgespalten und als Phenylthiohydantoin-Aminosäure über HPLC identifiziert wird (Edman und Begg, 1967). Diese Technik wird zunehmend durch die im Folgenden beschriebenen, auf massenspektrometrischen Fragmentspektren basierenden Sequenzierungsverfahren ersetzt. Ein großer Vorteil der massenspektrometrischen Verfahren gegenüber der Edman-Sequenzierung liegt in dem deutlich geringeren Probenbedarf und der wesentlich kürzeren Analysezeit (Wilm *et al.*, 1996). Weiterhin sind keine hohen Anforderungen an die Reinheit der Probe gestellt und es lassen sich im Gegensatz zur Edman-Sequenzierung auch N-terminal blockierte (z.B. durch Acetylierung, Formylierung) bzw. anderweitig modifizierte Peptide untersuchen.

Allerdings sind die Methoden in der Regel nur auf Peptide, nicht aber direkt auf Proteine anwendbar. Trotz vieler Verbesserungen besonders auf Seiten der Softwarealgorithmen reichen die Daten der Fragmentspektren nicht immer für eine eindeutige Sequenzierung aus. Ein weiterer Nachteil liegt in der Tatsache, dass mit den meisten Massenspektrometern nicht zwischen Leu- und Ile-Resten unterschieden werden kann.

2.2.3.1 De novo-Sequenzierung

Jedes Fragment in einer Fragmentserie (z.B. b-Serie) unterscheidet sich von seinem benachbarten Fragment in der Masse einer Aminosäure. Dadurch ist es möglich, die Aminosäuresequenz eines Peptids ausschließlich auf Basis seiner Fragmente zu ermitteln. Diese als *de novo*-Sequenzierung bezeichnete Sequenzierungsart ist folglich unabhängig von Nukleotid- oder Proteindatenbanken, weswegen auch Sequenzen von Peptiden unbekannter Proteine ermittelt werden können.

Obgleich die Prinzipien der *de novo*-Sequenzierung schon mehr als 30 Jahre alt sind (Biemann und Martin, 1987; Standing, 2003), wurde ihr routinemäßiger Einsatz erst durch instrumentelle Entwicklungen und leistungsfähige Softwarealgorithmen der letzten Jahre ermöglicht. Zahlreiche, teilweise sehr verschiedene Algorithmen zur Bestimmung von Peptidsequenzen aus MS²-, MS³- oder PSD-Spektren wurden in der Vergangenheit vorgestellt und sind zum Teil als Software verfügbar (Taylor und Johnson, 1997; Dancik *et al.*, 1999; Horn *et al.*, 2000; Zhang und McElvain, 2000; Chen *et al.*, 2001; Taylor und Johnson, 2001; Yergey *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2003; Demine und Walden, 2004; Spengler, 2004).

Trotz großer Fortschritte lassen sich manche Peptide nicht oder nur teilweise mittels *de no-vo*-Sequenzierung identifizieren. Die Ursachen liegen dabei in der Mehrdeutigkeit der Spektren aufgrund gleichzeitig auftretender Ionen-Serien, der Tatsache, dass Ionen-Serien zumeist unvollständig sind oder manche Aminosäuren (z.B. Lys und Gln) oder Aminosäurekombinationen sehr ähnliche Massen aufweisen (Peng und Gygi, 2001; Ma *et al.*, 2003). Der Erfolg der *de novo*-Sequenzierung hängt daher maßgeblich von der Qualität der Fragmentspektren ab, weshalb sich nur bestimmte Methoden eignen. Gute Ergebnisse lassen sich insbesondere mit diversen Hybrid-Massenspektrometern wie qTOF-, TOF-TOF- oder Ionenfallen-FT-ICR-Instrumenten erzielen, da diese Geräte auch bei der Aufnahme der Fragmentspektren über eine hohe Auflösung und Massengenauigkeit verfügen (Shevchenko *et al.*, 2000). Dadurch werden die Spektren leichter interpretierbar und die Zahl der Sequenzkandidaten verringert sich beachtlich.

In dieser Arbeit wurde die Software PEAKS Studio (Bioinformatics Solutions, Waterloo, ON, Kanada) eingesetzt (Ma *et al.*, 2003). Eine Besonderheit dieses Programms ist, dass die Daten der *de novo*-Sequenzierungen auch in Verbindung mit Proteindatenbanken zur Identifikation von Peptiden und Proteinen eingesetzt werden können, wodurch die Identifi-

kationsrate der Peptide gesteigert und die Zahl der falsch-positiven Sequenzen drastisch minimiert wird.

2.2.3.2 Datenbankgestützte Sequenzierung

Die datenbankgestützte Sequenzierung von Peptiden, die auch als PFF (engl. *peptide fragmentation fingerprinting*) bezeichnet wird, nutzt die in Abschnitt 2.2.2 beschriebene spezifische Fragmentierung von Peptiden. Das Prinzip unterscheidet sich von der *de novo*-Sequenzierung dadurch, dass für ein Peptid einer bestimmten Länge von Aminosäuren nicht alle theoretisch möglichen Kombinationen von Aminosäuren in Betracht gezogen werden,^b sondern nur die, die tatsächlich Bestandteil der Sequenzdatenbanken sind. Auf diese Weise genügen zumeist schon wenige Fragmente eines Peptids, um dieses identifizieren zu können. Dazu werden mittels geeigneter Algorithmen Informationen aus den Fragmentspektren mit den aus Genom- oder Proteindatenbanken abgeleiteten Peptiden abgeglichen. Statistisch bewertete Übereinstimmungen erlauben die Identifizierung des jeweiligen Peptids und des korrespondierenden Proteins mit einer definierten Wahrscheinlichkeit. Modifikationen an den Peptiden, z.B. posttranslationale Modifikationen (PTMs) oder Modifikationen durch die Probenvorbereitung, können während der Sequenzierung berücksichtigt werden.

Das Programm PeptideSearch basiert auf der Tatsache, dass massenspektrometrische Fragmentspektren wenigstens eine kleine Serie von Ionen leicht zu interpretierender Sequenzabschnitte beinhalten (Mann und Wilm, 1994). PeptideSearch nutzt zum Abgleich mit Sequenzdaten einen so genannten *peptide-sequence tag*, der aus einem kurzen Sequenzabschnitt und den beiden Massen dieses Bereichs zum jeweils anderen Terminus Peptids besteht.

Bei Sequest (Eng *et al.*, 1994) werden experimentelle Fragmentspektren durch Autokorrelation mit den simulierten Fragmentspektren in Frage kommender Peptide aus den Datenbanken abgeglichen. Diese Methode eignet sich insbesondere für Spektren mit geringen Signal-Rausch-Verhältnissen.

Die Software Mascot (Perkins *et al.*, 1999) errechnet ebenfalls Fragmentspektren und vergleicht diese mit experimentell erhaltenen. Dabei werden die Fragmente ausgehend von

^b Bei einem Hexapeptid sind dies beispielsweise $20^6 = 64\ 000\ 000$ Möglichkeiten.

ihren jeweiligen Intensitäten analysiert. Zudem wird errechnet, mit welcher Wahrscheinlichkeit es sich bei den Treffern um Zufälle handelt, womit eine kritische Bewertung der Ergebnisse möglich wird.

Neben diesen drei wichtigen und häufig verwendeten Algorithmen sind in den vergangenen Jahren weitere Algorithmen und Datenbanksuchprogramme entwickelt worden. Einen Überblick über die verschiedenen Programme und Funktionsweisen geben die Arbeiten von Fenyö (Fenyö, 2000) sowie Steen und Mann (Steen und Mann, 2004).

3 VERDAUSTUDIEN AN β-CASEIN

3.1 Einleitung

Caseine stellen mit 76 % bis 86 % den größten Bestandteil der Proteine der Milch dar. Es handelt sich um heterogene Proteine aus α_{s_1} -, α_{s_2} -, β - und κ -Casein. Diese machen jeweils ungefähr 38 %, 10 %, 36 % und 13 % des Gesamtcaseins aus. Weiterhin sind mit einem Anteil von ca. 3 % die γ -Caseine zu nennen, bei denen es sich um Spaltprodukte des β-Caseins handelt. Sie entstehen durch Proteolyse mit dem Milchenzym Plasmin (Davies und Law, 1980; Marchesseau et al., 2002). Weitere Heterogenität resultiert aus den posttranslationalen Modifikationen Phosphorylierung und Glykosylierung (nur κ-Casein). Alle Caseine – die γ -Caseine ausgenommen – sind hydrophobe und mit Molekülmassen zwischen ca. 19 000 u und 24 000 u recht kleine Proteine. Ihre Hydrophobizität nimmt in der Rangfolge α_{S2} - $< \alpha_{S1}$ - $< \kappa$ - $< \beta$ -Casein zu (Fox, 1989). Für das β -Casein-Gen (CSN2) sind bis heute die zehn Varianten A¹ bis A³ und B bis H nachgewiesen, die Unterschiede in insgesamt 14 der 209 Aminosäuren aufweisen (Grosclaude et al., 1972; Ribadeau-Dumas et al., 1972; Grosclaude et al., 1974; Baev et al., 1987; Jimenez-Flores et al., 1987; Stewart et al., 1987; Simons et al., 1993; Visser et al., 1995; Dong und Ng-Kwai-Hang, 1999; Han et al., 2000). Von diesen Varianten sind A², A¹ und B die in der Welt am häufigsten vorkommenden. Die Primärstruktur des ß-Caseins besteht aus 209 Aminosäuren^c und im Falle der Variante A² hat das Protein eine mittlere Molekülmasse von 23 983 u. Insgesamt sind fünf Serine des β-Caseins phosphoryliert, vier davon N-terminal in einem regelrechten Phosphatkomplex an den Positionen Ser15 und Ser17 bis Ser19 sowie ein weiteres an der Position Ser35. Seine hohe Hydrophobizität erlangt β-Casein in erster Linie durch den hydrophoben C-Terminus, wohingegen die geladene N-terminale Domäne mit den vier Phosphorylierungen dem Protein amphiphile Eigenschaften verleiht (Livney et al., 2004).

3.2 Bioaktive Peptide

Wie für die anderen Caseine sind auch für β -Casein zahlreiche Peptide mit verschiedenartigen biologischen Wirkungen bekannt, die durch proteolytische Spaltung *in vitro* oder *in*

^c Allen Angaben zu Positionen von Aminosäuren des β-Caseins liegt eine das Signalpeptid ausschließende Zählweise zu Grunde.

vivo entstehen. Ob von bioaktiven Peptiden aus der Nahrung Wirkungen im menschlichen Körper ausgehen können, hängt von mehreren Faktoren ab. Sind die Peptide bereits in den Nahrungsmitteln vorhanden, müssen sie den gastrointestinalen Verdau überstehen können. Sind sie jedoch als inaktive Bestandteile ihrer Vorläuferproteine in der Nahrung enthalten, ist zu klären, ob sie während der in Magen und Darm stattfindenden Proteolysen gebildet werden. Von nicht geringerem Interesse ist die Resorbierbarkeit dieser Stoffe. Sehr kleine Peptide wie Di- und Tripeptide zeigen eine hohe intestinale Resorptionsrate. Sie werden durch den intestinalen Peptidtransporter PEPT1 in die Zellen transportiert (Leibach und Ganapathy, 1996; Daniel, 2004), von wo aus sie auch in den Blutkreislauf gelangen können (Matsui *et al.*, 2002). Für Peptide von vier oder mehr Aminosäuren Länge ist kein solcher Transporter bekannt. Eine Resorption kann jedoch unter bestimmten Umständen, so z.B. aufgrund einer Durchlässigkeit der Darmschleimhaut bei einer gestörten Darmflora oder entzündlichen Erkrankungen, durch passive Diffusion stattfinden.

Bekannte Wirkungen von bioaktiven Peptiden bestehen in der Beteiligung an der Regulation der Nährstoffaufnahme sowie der Beeinflussung des postprandialen Stoffwechsels durch Stimulierung der Sekretion verschiedener Hormone. Darüber hinaus können sie einen anregenden Effekt auf das Immunsystem ausüben (Meisel *et al.*, 1989).

Phosphopeptide des β -Caseins, die auch als Caseinophosphopeptide (CPPs) bezeichnet werden, sind aufgrund ihrer hohen negativen Ladung relativ resistent gegenüber der gastrointestinalen Proteolyse. Sie bilden lösliche Komplexe mit Calcium, die die Fällung von Calciumphosphat verhindern (Berrocal *et al.*, 1989) und damit die intestinale Absorption und den Verbleib von Calcium im Körper fördern (Meisel und Schlimme, 1990; Séverin und Wenshui, 2005). Andere bioaktive Peptide wirken als Opioidagonisten (β -Casomorphine) (Meisel *et al.*, 1989; Smacchi und Gobbetti, 2000) oder zeigen immunstimulierende Effekte (Smacchi und Gobbetti, 2000). Für einige Peptide wurde eine Hemmung der Lipoxygenase (LOX) nachgewiesen (Rival *et al.*, 2001) und für die zahlreichen als β -Casokinine bezeichneten Peptide wurde eine Inhibierung des Angiotensin-I-Konversionsenzyms (ACE, EC 3.4.15.1) gefunden (Maeno *et al.*, 1996; Gobbetti *et al.*, 2000). Zu bioaktiven Peptiden der Milch ist eine Reihe von Übersichtsartikeln erschienen, auf die an dieser Stelle hingewiesen werden soll (Meisel und Bockelmann, 1999; Shah, 2000; Smacchi und Gobbetti, 2000; Gobbetti *et al.*, 2002; Pihlanto-Leppälä *et al.*, 2002; FitzGerald *et al.*, 2004; Séverin und Wenshui, 2005; Korhonen und Pihlanto, 2006). Die Bedeutung der bioaktiven Peptide wird auch angesichts einer in den vergangenen Jahren sehr kontrovers diskutierte Hypothese deutlich, nach der der Anteil von β -Casein A¹ in der Nahrung Einfluss auf das Auftreten mehrerer Krankheiten haben soll. Aus Daten, die auf das WHO-MONICA-Projekt zurückgehen (Kuulasmaa *et al.*, 2000), wurden Zusammenhänge insbesondere zur koronaren Herzkrankheit sowie Diabetes mellitus Typ 1 gefunden (McLachlan, 2001; Laugesen und Elliott, 2003). Für diese Beziehung wird die potenzielle Freisetzung des äußerst starken opioiden Agonisten β -Casomorphin 7 (β -CN 60-66) (Koch *et al.*, 1985) verantwortlich gemacht. In der A¹-Form des β -Caseins ist die C-terminal benachbarte Aminosäure dieses Fragments His, das eine Spaltung an dieser Position und damit die Freisetzung des Peptids nicht hindert, während es Pro im Falle von A² tut. Obgleich bereits genetisch kontrollierte, auf β -Casein A² basierende Produkte vermarktet werden, ist die Richtigkeit dieser Hypothesen umstritten (Swinburn, 2004; Truswell, 2005; Woodford, 2006; Truswell, 2006).

3.3 Zielstellung

Die meisten der bekannten bioaktiven Peptide wurden durch die Proteolyse mit Trypsin, Proteinase K oder aber synthetisch gewonnen. Die Entstehung dieser Peptide *in vivo* durch gastrointestinalen Verdau ist jedoch bisher nicht im Detail untersucht worden. Bevor die Nahrung in den Darm gelangt, passiert sie zunächst den Magen, in dem sie je nach Zusammensetzung bis zu mehreren Stunden verbleibt. Dort durchlaufen die Proteine eine Proteolyse unter Einwirkung des Enzyms Pepsin (EC 3.4.23.1), einer Aspartatprotease, die ihre höchste Aktivität bei pH-Werten zwischen 1 und 2 besitzt (Loken *et al.*, 1958).

Während die Proteolyse des β -Caseins mit spezifischen Proteasen wie Trypsin oder Chymotrypsin gut untersucht ist (Leadbeater und Ward, 1987; Lemieux und Amiot, 1989), gibt es nur wenige Erkenntnisse zu dieser wichtigen Phase menschlicher Verdauung von Milchproteinen (Svedberg *et al.*, 1985). Ein genaues Verständnis ist jedoch erforderlich, um Aussagen darüber treffen zu können, ob solche bioaktiven Peptide überhaupt entstehen können. Es wurde daher das Ziel verfolgt, in einer systematischen Studie zu untersuchen, welche Peptide des β -Caseins beim peptischen Verdau unter gastroanalogen Bedingungen freigesetzt werden und ob die Regionen, in denen bioaktive Peptide kodiert sind, unversehrt bleiben. Da die Verweildauer der Nahrung im Magen je nach Zusammensetzung und Grad der Zerkleinerung während des Kauens sehr unterschiedlich ausfallen kann, waren auch zeitliche Aspekte der Proteolyse von Interesse. Weiterhin sollte untersucht werden, an welchen Aminosäuren Pepsin spaltet.

3.4 Ergebnisse und Diskussion

3.4.1 Gastroanaloge Proteolyse von β-Casein

(Anhang 9.1: Schmelzer et al. 2004, Anhang 9.2: Schmelzer et al. 2007)

In der ersten Studie lag ein Schwerpunkt neben der Methodenentwicklung selbst auf dem Nachweis von Di- und Tripeptiden. Da diese als Substrate des PEPT1-Carriers resorbiert werden können, sind sie hinsichtlich möglicher biologischer Aktivität besonders interessant. Nach dem peptischen Verdau des β-Caseins, bei dem die gastrischen Bedingungen im Hinblick auf Temperatur, pH-Wert, Proteolysedauer und Enzym-Substrat-Verhältnis simuliert wurden, wurde das Peptidgemisch mit Membranfiltern fraktioniert und mittels LC/ESI-MS/MS an einer Quadrupol-Ionenfalle sowie MALDI-TOF-PSD untersucht. Die Fragmentspektren wurden mit der Software Mascot Distiller (Matrix Science, London, UK) aufbereitet und die Peptide mit der Datenbanksuchmaschine Mascot (Matrix Science) identifiziert.

Bei den MALDI-Messungen wurden die Matrizes CHCA, Sinapinsäure und DHB eingesetzt, wobei sich mit den ersten beiden die besten Ergebnisse erzielen ließen. In Abbildung 1 in Anhang 9.1 sind die Spektren einer Fraktion gegenübergestellt, die bei identischen Geräteeinstellungen mit CHCA bzw. mit Sinapinsäure vermessen wurde. Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass einige der Peptide ausschließlich mit einer der beiden Matrizes detektiert wurden, andere zum Teil große Unterschiede in den relativen Intensitäten aufwiesen. So erreicht beispielsweise β -CN 143-163 ($m_m = 2467, 2$ u) bei Verwendung von Sinapinsäure die höchste Intensität im Gesamtspektrum, bei CHCA hingegen nur eine relative Intensität von ca. 8 %. Interessant sind weiterhin die sich je nach Matrix umkehrenden Intensitätsverhältnisse der beiden Peptide β -CN 192-209 ($m_m = 1993, 1$ u) und β -CN 193-209 ($m_m = 1880, 1$ u), die sich nur durch das Vorhandensein eines Leu am N-Terminus unterscheiden. Sinapinsäure wird zumeist ein Anwendungsbereich für Analysen größerer Peptide oder Proteine zugeschrieben (Bahr *et al.*, 1994). In den in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen an komplexen Peptidgemischen zeigte sich jedoch, dass sich durch parallele Verwendung von Sinapinsäure und CHCA auch für den Massenbereich unterhalb 2500 u deutlich mehr Ergebnisse erhalten lassen, weswegen auch in Folgeexperimenten mindestens diese beiden Matrizes parallel eingesetzt wurden. Mit der LC/ESI-MS/MS konnten insbesondere viele kleine Peptide identifiziert werden, darunter zwei Di- und fünf Tripeptide. Insgesamt wurden 41 verschiedene Peptide mit Längen zwischen 2 und 36 Aminosäuren identifiziert, mit denen eine Sequenzabdeckung von 75 % erreicht wurde.

In der zweiten Studie wurden während des Verdaus zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen, die mittels UV-HPLC untersucht wurden (siehe Abbildung 1 in Anhang 9.2). Drei der Proben (nach 10 min, 30 min und 60 min Proteolyse) wurden mittels Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) fraktioniert. Die Fraktionen wurden dann mit statischer Nano-ESI-MS/MS an einem qTOF vermessen. Die Offline-Kopplung zwischen HPLC und Nano-ESI wurde einer Online-Kopplung vorgezogen, da auf diese Weise praktisch unbegrenzt Zeit für Tandem-MS-Experimente zur Verfügung steht. Dadurch war es möglich, das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern und auch sehr schwache Signale sichtbar zu machen. Die Fraktionen wurden außerdem mittels MALDI-TOF-PSD analysiert. Durch die HPLC-Vortrennung konnten Probleme, die aus der geringen Auflösung des Ionenselektors (engl. *ion gate*) im PSD-Modus bei komplexen Gemischen resultieren, weitgehend umgangen werden. Neben einer datenbankgestützten Sequenzierung der PSD- und qTOF-MS/MS-Daten mit Mascot wurden letztere Fragmentspektren auch einer *de novo*-Sequenzierung mit anschließender Datenbanksuche unterzogen.

Durch die Kombination dieser leistungsfähigen Methoden konnte eine vollständige Sequenzabdeckung erreicht werden, indem 119 verschiedene β -CN-Peptide, inklusive dreier Phosphopeptide, identifiziert wurden. Die Peptide wiesen eine außerordentlich breite Größenverteilung zwischen 4 und 84 Aminosäureresten Länge auf. Das größte identifizierte Peptid, β -CN 59-142 ($m_m = 9303,9$ u), wurde anhand seines sechsfach geladenen Vorläufer-Ions [M+6H]⁶⁺ (Abbildung 3) über eine Dauer von 35 min mittels Nano-ESI-MS/MS fragmentiert (Abbildung 4) und unter Verwendung von Mascot identifiziert.



Abbildung 3: Isotopencluster des $[M+6H]^{6+}$ -Ions des Peptids β -CN 59-142.



Abbildung 4: Dekonvolutiertes Tandem-Massenspektrum des Peptids β -CN 59-142 ($m_m = 9303,9 u$) mit der Sequenz VYPFPGPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVKEAMAPKHKEMPFPKYPVEPFTES-QSLTLTDVENLHLPLPLLQS.

3.4.1.1 Zeitlicher Verlauf

Die Degradation beginnt unmittelbar nach Zugabe der Enzym- zur Substratlösung. In Abbildung 1 in Anhang 9.2 sind die HPLC-Chromatogramme der Proben, die zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen wurden, gegenübergestellt. Bereits nach einer Minute sind erste Peaks von Abbauprodukten im Chromatogramm bei Retentionszeiten von 42 min bis 47,5 min erkennbar. Dabei zeigte sich, dass es sich ausschließlich um Peptide des C-Terminus (β -CN 190-209) handelt. In den Fraktionen zusätzlicher Peaks nach zehnminütiger Proteolyse wurden Peptide aus dem sich anschließenden Bereich β -CN 164-192 sowie aus den nächsten Abschnitten in N-terminaler Richtung, β -CN 143-163 und β -CN 126-163, nachgewiesen. Nach 30 min wurde neben weitergespaltenen Peptiden dieser Bereiche nur das Peptid β -CN 69-93 gefunden. Bis zu einer Inkubationszeit von 60 min nahm die Zahl der Peptide deutlich zu. Es konnten in den Fraktionen dieser Probe Peptide aus der gesamten Sequenz des β -Caseins inklusive des phosphorylierten N-Terminus identifiziert werden. Zwischen 60 min und 180 min gab es nur noch geringfügige Änderungen in den Chromatogrammen, woraus geschlussfolgert werden kann, dass die enzymatische Spaltung nach einer Stunde überwiegend abgeschlossen war.

3.4.1.2 Bildung bioaktiver Peptide

In den beiden Untersuchungen sind an insgesamt 61 der 208 Peptidbindungen des β -Caseins Spaltungen nachgewiesen worden, die über die gesamte Sequenz verteilt sind. In Abbildung 5 sind diese Spaltstellen gemeinsam mit den Bereichen bioaktiver Peptide dargestellt. Lediglich vier Schnittstellen aus der ersten Studie (Schmelzer *et al.*, 2004) sind nicht mit den Methoden der zweiten Arbeit (Schmelzer *et al.*, 2007) identifiziert worden, wohingegen in letzterer 33 zusätzliche Spaltstellen nachgewiesen werden konnten.

Der Abbildung 3 in Anhang 9.2 lassen sich die Spaltstellen hinsichtlich ihres zeitlichen Auftretens entnehmen. Es wird ersichtlich, dass die Wahrscheinlichkeit einer Freisetzung mit zunehmender Verdauzeit und damit Verweildauer im Magen abnimmt. Obwohl die tatsächlichen gastrischen Bedingungen *in vivo* gegenüber den in diesen Studien simulierten ungleich komplexer sind, machen die erhaltenen Ergebnisse die Entstehung zahlreicher bioaktiver Peptide mit intakter Sequenz unwahrscheinlich. So zeigt sich beispielsweise für die Bereiche, in denen die ACE-hemmenden Peptide β-CN 140-143, β-CN 169-174 und

 β -CN 169-175 (Maeno *et al.*, 1996) oder das β-Casokinin β-CN 80-90 (Abubakar *et al.*, 1998) kodiert sind, eine Vielzahl von Spaltungen. Auch innerhalb des Bereichs, in dem β-Casomorphin 7 (β-CN 60-66) enthalten ist, wurden zwei Spaltungen nachgewiesen.



Abbildung 5: Aminosäuresequenz von bovinem β -Casein, Variante A^2 mit der Swiss-Prot Accession-Nummer <u>P02666</u>. Die Bereiche bekannter bioaktiver Peptide sind unterstrichen. Die Quadrate kennzeichnen die Schnittstellen, die nach der Proteolyse mit Pepsin identifiziert wurden: \blacklozenge - Schnittstellen aus Schmelzer et al., 2004 (Anhang 9.1), \blacklozenge - Schnittstellen aus Schmelzer et al., 2007 (Anhang 9.2) und \blacklozenge - Schnittstellen aus beiden Arbeiten. Die mit "-p" gekennzeichneten Serine markieren die Positionen der Phosphorylierungen.

Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass an den meisten Positionen partiell gespalten wurde und somit von den Spaltstellen allein nur bedingt auf die Erhaltung der Bereiche bioaktiver Peptide geschlossen werden kann. Die Abbildung 2 in Anhang 9.2 gibt ein detailliertes Bild über die Situation. So ist beispielsweise β -Casokinin 10 (β -CN 193-202), für das immunstimulierende Eigenschaften beschrieben wurden (Meisel und Schlimme, 1994), im C-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert, für den gezeigt werden konnte, dass er besonders schnell abgebaut wird. Es wurden jedoch auch einige längerkettige Peptide des C-Terminus identifiziert, an denen diese Spaltstellen offenbar übersprungen wurden. Es muss daher angenommen werden, dass Bereiche bioaktiver Peptide trotz der vielen Spaltstellen zumindest teilweise unversehrt bleiben. Eindeutiger ist die Situation für die Bereiche, in denen der Opioidagonist β-CN 41-44 (Fiat et al., 1993), das immunstimulierende Peptid β-CN 63-68 (Smacchi und Gobbetti, 2000), das LOX-inhibierende Peptid β-CN 98-105 sowie β-Casokinin 7 (β-CN 177-183) (Maruyama et al., 1985; Rival et al., 2001) enthalten sind. Innerhalb dieser Sequenzabschnitte konnten keine Spaltstellen nachgewiesen werden, woraus sich schlussfolgern lässt, dass sie sehr wahrscheinlich den peptischen Verdau unversehrt überstehen. In Tabelle 1 sind darüber hinaus einige identifizierte Peptide aufgeführt, die mit gleicher oder geringfügig kürzerer Sequenz in der Literatur mit Bioaktivitäten beschrieben wurden.

Tabelle 1: Vergleich der Sequenzen bioaktiver Peptide aus der Literatur mit identifizierten Peptidsequenzen nach dem peptischen Verdau des β -Caseins. Die Übereinstimmungen in den Sequenzen sind durch Unterstreichung hervorgehoben.

		Experiment			
Peptid	Sequenz	Bioaktivität	Referenz	Peptid	Sequenz
β-CN 60-70	YPFPGPIPNSL	Opioid	Meisel und Schlimme, 1989	β-CN 59-70	V <u>YPFPGPIPNSL</u>
β-CN 75-82	PPLTQTPV	ACE-Hemmung	Gobetti et al., 2000	β-CN 75-83	<u>PPLTQTPV</u> V
β-CN 177-183	AVPYPQR	ACE-Hemmung	Rival et al., 2001	β-CN 177-183	AVPYPOR
β-CN 191-193	LLY	Immunstimulierend	Fiat et al., 1993	β-CN 190-193	FLLY

3.4.1.3 Spaltstellen des Pepsins

Pepsin ist eine Endopeptidase mit Aspartat-Reaktionszentrum, die eine sehr breite Spezifität aufweist und bevorzugt an großen hydrophoben Aminosäureresten spaltet. Die Spezifität wird dabei durch die Struktur der acht Substratbindungsstellen der Bindungstasche des Enzyms bestimmt (Tang, 2004). Für Pepsin sind in der Literatur Schnittstellen C-terminal von Phe, Leu, Trp, Tyr, Ala, Glu und Gln beschrieben worden (Konigsberg et al., 1963; Oka und Morihara, 1970). Wie aus Abbildung 3 in Anhang 9.2 hervorgeht, zeigte sich in den Experimenten ein Zusammenhang zwischen Inkubationsdauer und Spezifität. Nach zehnminütiger Proteolyse wurden vorwiegend Spaltstellen C-terminal von Leu gefunden. Zu späteren Zeitpunkten wurden hingegen zahlreiche Spaltstellen C-terminal von anderen der genannten Aminosäureresten, aber auch von Met, Ser, Thr und weiteren Resten identifiziert, an denen Pepsin offenbar weniger bevorzugt spaltet. Diese Schnittstellen wurden zum Teil auch von Fujioka und Scheraga gefunden (Fujioka und Scheraga, 1965). Insgesamt war eine Spezifität nach längeren Inkubationszeiten praktisch nicht mehr zu erkennen. Erstaunlicherweise wurden auch einige Spaltstellen C-terminal von Arg und Lys identifiziert. Bei Untersuchungen des Pepsins mit MALDI-TOF konnten keine Verunreinigungen mit anderen Enzymen nachgewiesen werden. Da das verwendete Pepsin aus der Magenschleimhaut gewonnen wurde, ist eine Trypsinkontamination unwahrscheinlich. Gegen einen Zusammenhang dieser Spaltstellen mit Trypsin spricht außerdem, dass das Enzym bei dem verwendeten pH-Wert von 2 keine Aktivität aufweisen würde.

3.4.1.4 Identifikation einer neuen genetischen Variante

In der Vergangenheit wurden für zwei Positionen in der Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz des β-Caseins gegensätzliche Ergebnisse gefunden. Jimenez-Flores et al. klonierten und sequenzierten cDNA von bovinem β-Casein und identifizierten in der Nukleotidsequenz für die Positionen der translatierten Aminosäuren 93 und 195 die Basentripletts CTG und CAG,^d die den Aminosäuren Leu und Gln entsprechen (Jimenez-Flores et al., 1987). In anderen publizierten Sequenzen von bovinem
ß-Casein wurden hingegen die Tripletts ATG und GAG für die translatierten Aminosäuren Met und Glu bzw. die Aminosäuren selbst identifiziert (Ribadeau-Dumas et al., 1972; Stewart et al., 1987; Simons et al., 1993; Visser et al., 1995; Dong und Ng-Kwai-Hang, 1999; Han et al., 2000). Abgesehen von den Unterschieden in der Natur dieser beiden Aminosäurepositionen, die letztlich nur auf jeweils eine unterschiedliche Nukleinbase zurückgehen ($C \rightarrow A$ und $C \rightarrow G$), ist die von Jimenez-Flores et al. ermittelte Sequenz identisch mit der A²-Form, die von Ribadeau-Dumas et al. identifiziert wurde (Ribadeau-Dumas et al., 1972). Die beiden Unterschiede werden in den Proteindatenbanken als Sequenzkonflikte behandelt. Im Jahr 2002 veröffentlichten Jann et al. eine Arbeit zu den Exons 6 und 7 des β-Casein-Gens (CSN2), bei der sie einen DNA-Test zur Genotypisierung an 318 Tieren sieben unterschiedlicher Rassen mittels PCR-SSCP durchführten. Die Sequenzierung einer unbekannten Bande ergab die Punktmutation der ersten Nukleinbase des Tripletts der Aminosäure 93 (Jann et al., 2002). Dieses Allel wurde von den Autoren mit CSN2*I bezeichnet. Die Autoren berücksichtigten in ihrem Artikel allerdings nicht die 15 Jahre zuvor von Jimenez-Flores et al. publizierte Sequenz, aus der diese und eine weitere Mutation bereits hervorgegangen waren (Jimenez-Flores et al., 1987).

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Studie kam β -Casein aus zur Nahrung bestimmter boviner Milch neuseeländischer Herkunft zum Einsatz, die von verschiedenen Tieren stammt und nachweislich verschiedene genetische Varianten enthält. 100 % der A²-Form konnten wiedergefunden werden, allerdings wurden auch Peptide mit His anstelle von Pro an der Position 67 detektiert, die höchstwahrscheinlich von der ebenfalls sehr ver-

^d Zur besseren Unterscheidung werden hier und im folgenden Text die Einbuchstabencodes der Aminosäuren mit Großbuchstaben und die der Nukleinbasen mit Kapitälchenformatierung angegeben.

breiteten Variante A¹ stammen. Interessanter ist, dass ein großes Peptid (β -CN 59-93) sequenziert wurde, das am C-Terminus (Position 93) ebenfalls ein Leu besitzt:^e

L.VYPFPGPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVL.G.

Die zur A²-Variante homologe Sequenz besitzt hingegen ein C-terminales Met:

L.VYPFPGPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVM.G.

Da der Massenunterschied zwischen diesen beiden Peptiden $\Delta m \approx 18$ u beträgt, kam neben einem Aminosäureaustausch (Met \rightarrow Leu/Ile) auch eine Wasserabspaltung an einem der Ser oder Thr als Ursache in Betracht. Diese Modifikation wurde mehrfach in diesem Bereich des Proteins gefunden. Der in Mascot erzielte Ions score betrug jedoch nur 38 für das A²-Peptid mit einer Dehydratisierung am Thr80, wohingegen für das Peptid mit der C-terminalen Variation ein Wert von 75 erhalten wurde. B-CN 59-93(M) wurde ebenfalls detektiert und fand sich am intensivsten in einer Fraktion mit einer um ca. eine Minute kürzeren Retentionszeit. In Abbildung 4 in Anhang 9.2 sind die annotierten Fragmentspektren der beiden homologen Peptide β-CN 59-93(M) und β-CN 59-93(L) gegenübergestellt. Daraus geht deutlich hervor, dass die b-Serie beider Peptide identisch ist, wohingegen die Massen der jeweiligen y-Fragmente eine Differenz von 18 u aufweisen. Dies belegt zweifelsfrei, dass der Massenunterschied von 18 u in der C-terminalen Aminosäure seinen Ursprung hat. Läge tatsächlich eine Dehydratisierung an einem Ser oder Thr der Sequenz vor, ergäben sich vollständig andere b- und y-Serien. Zusätzlich wurden für dieses Peptid akkurate Massenbestimmungen durchgeführt. Die monoisotopische Masse des mittels einer Kombination aus de novo-Sequenzierung und Datenbanksuche identifizierten Peptids beträgt $m_{\rm m} = 3804,0906$ u, das abundante und untersuchte dreifach protonierte Molekül $[M+3H]^{3+}$ hat damit den *m/z*-Wert 1269,0375. Das dehydratisierte Peptid ohne Aminosäureaustausch hätte hingegen eine Masse von $m_{\rm m} = 3804,0364$ u bzw. für das Ion $[M+3H]^{3+}$ den m/z-Wert 1269,0194. Die Differenz zwischen den m/z-Werten dieser beiden Varianten beträgt damit 0,0181 bzw. 14,3 ppm.

^e Das Peptid wird im Folgenden als β-CN 59-93(L) bezeichnet, das der A²-Variante entsprechende mit β-CN 59-93(M).



Abbildung 6: Elektrospray-FT-ICR-Massenspektrum des Isotopenclusters des dreifach geladenen Peptids β -CN 59-93(L) mit dem theoretischen m/z-Wert 1269,0375 (Abweichung bei Verwendung des zweiten Peaks des Isotopenclusters: 1,4 ppm).



Abbildung 7: Nano-ESI-qTOF-Massenspektrum der beiden parallel detektierten Varianten des dreifach geladenen Peptids β -CN 59-93 mit unterschiedlichem C-Terminus (Leu bzw. Met) sowie des ebenfalls dreifach geladenen Peptids β -CN 58-93 der A^2 -Form, dessen monoisotopischer Peak zur akkuraten Massenbestimmung als Lockmasse verwendet wurde. Die Abweichung der Masse für β -CN 59-93(L) beträgt 0,8 ppm.

Akkurate Massenbestimmungen wurden an dem in dieser Arbeit verwendeten Q-TOF-2 (Waters/Micromass, Manchester, UK) sowie an einem Apex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) FT-ICR-Massenspektrometer durchgeführt. In den Messergebnissen zeigte sich innerhalb der Gerätetoleranzen eine Übereinstimmung mit der Masse des *de novo* sequenzierten Peptids (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7). Dieses Peptid belegt zusammen mit den Ergebnissen von Jann *et al.* die Existenz einer weiteren genetischen β -Casein-Variante, die bereits von Jimenez-Flores *et al.* veröffentlicht, bisher jedoch nicht bzw. falsch klassifiziert wurde (Jimenez-Flores *et al.*, 1987; Jann *et al.*, 2002). Entsprechend der bisherigen Nomenklatur sollte diese elfte genetische Variante als β -Casein I bezeichnet werden.

3.4.2 Untersuchung proteolytischer Spaltungen mittels Quarzmikrobalance in Echtzeit (Anhang 9.3: Huenerbein *et al.* 2007)

In dieser Studie wurde ein neues Verfahren erprobt, mit dem proteolytische Verdauvorgänge online verfolgt werden können. Zum Einsatz kam dazu die Quarzmikrobalance (engl. *quartz crystal microbalance*, QCM), mit der sehr sensitiv Änderungen an der Grenzfläche fest/gasförmig oder – wie in dieser Arbeit – an der Grenzfläche fest/flüssig untersucht werden können. Bei der QCM-Technik wird ein Schwingquarz, auf dessen gegenüberliegenden Seiten Elektroden aufgebracht sind, durch Anlegen einer Wechselspannung zu lateralen Oberflächenschwingungen infolge des reziproken piezoelektrischen Effektes angeregt. Masseanlagerungen auf der Quarzoberfläche sowie Änderungen der Dichte oder Viskosität resultieren in einer messbaren Verschiebung der Resonanzfrequenz und/oder Dämpfung. Auf diese Weise lassen sich zum Beispiel Reaktionen und Interaktionen mit Proteinen verfolgen (Kawakami *et al.*, 1999; Höök *et al.*, 2001). Einer der beiden Bindungspartner muss dazu vor dem QCM-Experiment auf der Quarzoberfläche immobilisiert werden, wofür eine Reihe von Methoden beschrieben sind (Liu *et al.*, 2001). Nachdem das System stabile Bedingungen erreicht hat, wird der andere Interaktionspartner dem Quarzsensor stationär oder im Durchfluss zugeführt.

Am Beispiel des Modellproteins β-Casein wurde überprüft, ob sich mit der Quarzmikrobalance proteolytische Spaltungen in Echtzeit und in der Weise verfolgen lassen, dass Rückschlüsse auf kritische Einflussfaktoren wie beispielsweise pH-Wert oder Temperatur möglich sind. Zu diesem Zweck wurde das auf dem Quarzsensor immobilisierte β-Casein den
Enzymen Trypsin bei pH 5,4, pH 6,4 und pH 7,4 sowie Pepsin bei pH 2, pH 3 und pH 4 ausgesetzt. Dabei konnte die Proteolyse durch den Anstieg der Resonanzfrequenz sowie durch eine Abnahme der Impedanz verfolgt werden. Dies ist am Beispiel des tryptischen Verdaus in Abbildung 4 in Anhang 9.3 gezeigt. Die höchste Aktivität des Pepsins liegt zwischen pH 1 und pH 2 (Loken *et al.*, 1958), wohingegen sie bei höheren pH-Werten aufgrund von Konformationsänderungen deutlich abnimmt (Campos und Sancho, 2003). Trypsins maximale proteolytische Aktivität liegt bei pH-Werten zwischen 7 und 9 (Vorob'ev *et al.*, 2000). Eine signifikante Abnahme der Aktivität beim Verlassen dieser pH-Bereiche konnte für beide Enzyme auch anhand der QCM-Experimente nachgewiesen werden, wie aus den jeweiligen Frequenzänderungen in den Abbildungen 5 und 6 des Anhangs 9.3 hervorgeht.

Da jedoch auf Basis der QCM-Daten keine qualitativen Aussagen über die Entstehung der Abbauprodukte gemacht werden können, wurden die abgespaltenen Peptide nach einem Aufkonzentrierungsschritt mittels MALDI-TOF untersucht. Dies ist besonders unter dem Aspekt interessant, dass das Protein während der Proteolyse nicht in Lösung, sondern auf einer Oberfläche immobilisiert vorliegt. Wie aus Abbildung 7 in Anhang 9.3 hervorgeht, wurden interessanterweise keine qualitativen Unterschiede bei dem Vergleich mit einem *in vitro* durchgeführten Kontrollexperiment festgestellt.

4 STRUKTURUNTERSUCHUNGEN AN ELASTIN

4.1 Einleitung und Zielstellung

Elastische Fasern besitzen die außergewöhnliche Eigenschaft reversibler Dehnbarkeit und sind daher in vielen Geweben vorzufinden, die elastischen Verformungen ausgesetzt sind. Elastische Fasern haben eine sehr lange Existenzdauer und bestehen ultrastrukturell aus den Mikrofibrillen und dem Protein Elastin. Die Elastinmonomere sind untereinander auf einzigartige Weise durch Quervernetzungen zu einem dreidimensionalen Netzwerk verbunden, durch das die Fasern große Elastizität erlangen.

Zahlreiche pathologische Zustände werden mit degenerativen Veränderungen des Elastins in Verbindung gebracht. So treten mit zunehmendem Alter Veränderungen in der der Sonnenstrahlung ausgesetzten Haut auf, die sich in Form von Faltenbildung und Erschlaffung äußern (Kligman und Kligman, 1986; Gilchrest, 1989). Für Erkrankungen wie das Williams-Beuren-Syndrom (Ewart *et al.*, 1993a; Urbán *et al.*, 2000b), supravalvuläre Aortenstenose (Ewart *et al.*, 1993b; Li *et al.*, 1997; Urbán *et al.*, 2000a), Cutis laxa (Zhang *et al.*, 1999), Lungenemphysem (Mandl *et al.*, 1977), Aneurysma (Perejda *et al.*, 1985) und Arteriosklerose (Robert *et al.*, 1970; Robert *et al.*, 1998) wurden direkte Zusammenhänge mit pathologischen Veränderungen des Elastins gefunden.

Strukturelle Untersuchungen an Elastin können wichtige Beiträge zum Verständnis biochemischer Vorgänge liefern, die mit alterungsbedingten oder pathologischen Veränderungen der elastischen Fasern einhergehen. Allerdings werden Untersuchungen dadurch erheblich erschwert, dass das Protein in Wasser, aber auch in organischen Lösungsmitteln vollständig unlöslich ist und sich nur schwer aus den Geweben gewinnen lässt.

In der Vergangenheit wurde Elastin meist einer partiellen oder vollständigen sauren Hydrolyse unterzogen und die resultierenden Aminosäuren, inklusive der für Elastin einzigartigen quervernetzten Aminosäuren Desmosin und Isodesmosin, wurden analysiert (Partridge *et al.*, 1955; Salomoni *et al.*, 1991; Spacek *et al.*, 1998; Kaga *et al.*, 2003). Diese Herangehensweise setzt allerdings eine hohe Reinheit des isolierten Elastins voraus, da nach der Hydrolyse der Ursprung der Aminosäuren nicht mehr geklärt werden kann. Die Möglichkeiten, auf diesem Wege zu Strukturinformationen des Gesamtmoleküls zu gelangen, sind äußerst limitiert. Es wurde daher in dieser Arbeit nach anderen Möglichkeiten der Charakterisierung des Elastins gesucht, die es gestatten, aussagekräftigere Informationen zur Struktur bzw. zu Strukturveränderungen zu erhalten. Im Gegensatz zu einer Vielzahl früherer Arbeiten sollte das Protein nicht mittels saurer Hydrolyse in Aminosäuren, sondern mithilfe von Proteasen unterschiedlicher Spezifität in Peptide gespalten werden. Diese sollten dann mit massenspektrometrischen Methoden identifiziert werden. Modifikationen, die z.B. infolge pathologischer Zustände auftreten, haben bei dieser Vorgehensweise wesentlich höhere Chancen erhalten zu bleiben, da das Protein nicht den aggressiven Bedingungen der sauren Hydrolyse, wie sehr geringem pH-Wert und hohen Temperaturen, ausgesetzt ist.

Ein erster Schwerpunkt lag auf der Entwicklung und Evaluierung massenspektrometrischer sowie bioinformatischer Methoden. Dazu wurden Untersuchungen an rekombinant hergestelltem Tropoelastin, dem löslichen Vorläufer des Elastins, vorgenommen. Ziel war es dabei, die Methoden soweit zu optimieren, dass eine möglichst vollständige Sequenzabdeckung erreicht werden kann.

Diese Methoden wurden dann an humanem Elastin der Haut angewendet. Neben der Methodenentwicklung selbst lagen die Schwerpunkte bei der Charakterisierung der Peptide in der Eingrenzung der Isoform des Hautelastins und in dem Nachweis möglicher Hydroxylierungen der Proline.

4.2 Das elastische Fasersystem

Elastische Fasern sind essentielle extrazelluläre Matrixmoleküle des Bindegewebes aller Vertebraten mit Ausnahme einiger niederer Vertreter wie der Neunaugen (Debelle und Tamburro, 1999). Elastische Fasern wurden in Arterien, Lunge, Haut, Ligamenten, Stimmbändern und in elastischem Knorpel gefunden. Sie verleihen Gewebe, das wiederholt mechanischer Verformung ausgesetzt werden muss, Elastizität und Stabilität. Die morphologische Struktur der elastischen Matrix ist dem jeweiligen Gewebe angepasst. In der Haut, der Lunge und den Ligamenten treten die Fasern in Form feiner Netzwerke auf, die das Gewebe durchziehen (Dahlbäck *et al.*, 1990; Vrhovski und Weiss, 1998; Starcher, 2000). Im Knorpelgewebe weisen die Netzwerke große, dreidimensionale wabenartige Strukturen auf (Dietz *et al.*, 1994; Pasquali-Ronchetti und Baccarani-Contri, 1997) und in Blutgefäßen sind die Fasern in Form schmaler, konzentrischer Lamellen angeordnet (Li *et al.*, 1998).

Elastische Fasern bestehen aus zwei klar unterscheidbaren Komponenten, einem Elastin-Kern und den ihn umhüllenden fibrillinreichen Mikrofibrillen (Greenlee *et al.*, 1966; Ross und Bornstein, 1969). Das Protein Elastin, das über 90 % des Gesamtanteils der elastischen Fasern ausmacht (Ross, 1973), liefert den entscheidenden Beitrag zu den mechanischen Eigenschaften der Fasern, die eine hohe reversible Dehnbarkeit von bis zu 220 % aufweisen (Fung, 1993).

4.2.1 Elastin

Elastin ist das hydrophobste aller bekannten Proteine (Cleary und Gibson, 1996) und vollständig unlöslich in Wasser, aber auch in organischen Lösungsmitteln. Es ist äußerst beständig und wird in gesundem Gewebe offenbar nicht abgebaut. Es wird angenommen, dass es eine Halbwertszeit von ca. 70 Jahren hat (Petersen *et al.*, 2002). Elastin wird durch Quervernetzung der Lysinreste aus der löslichen Vorstufe Tropoelastin gebildet. Dieser Vorgang wird durch das Enzym Lysyloxidase (Kagan *et al.*, 1986) oder von Vertretern der Lysyloxidase-ähnlichen Proteine initiiert (Liu *et al.*, 2004; Noblesse *et al.*, 2004). Zu den Organgeweben, die reich an Elastin sind, gehören die Aorta (30 % bis 57 %),^f andere große Blutgefäße (28 % bis 32 %), elastische Bänder (50 %), die Lunge (3 % bis 7 %), Sehnen (4 %) und die Haut (2 % bis 3 %) (Vrhovski und Weiss, 1998; Mithieux und Weiss, 2005).

4.2.2 Mikrofibrillen

Im sich bildenden Gewebe sind die aus verschiedenen Makromolekülen bestehenden Mikrofibrillen die zuerst entstehenden Komponenten der extrazellulären Matrix. Sie haben Durchmesser zwischen 10 nm und 12 nm (Ross, 1973) und fungieren als Gerüst für den Einbau der Tropoelastineinheiten (Mithieux und Weiss, 2005). Die Hauptkomponenten der Mikrofibrillen sind die zwei Isoformen des Fibrillins, Fibrillin-1 (Sakai *et al.*, 1986) und Fibrillin-2 (Zhang *et al.*, 1994), sowie das Mikrofibrillen-assoziierte Glykoprotein (MAGP) MAGP-1 (Gibson *et al.*, 1991). Die Fibrilline sind ca. 350 000 u große, Cysteinreiche Glykoproteine, deren Primärstruktur durch sich wiederholende Abschnitte geprägt ist, die dem epidermalen Wachstumsfaktor ähnlich sind. MAGP-1 ist ein 31 000 u großes Glykoprotein, das kovalent an die Mikrofibrillen gebunden ist. Weitere beteiligte Proteine

^f Die prozentualen Angaben beziehen sich auf das Trockengewicht des jeweiligen Gewebes.

sind unter anderem die Lysyloxidase (Kagan *et al.*, 1986), Vitronektin (Dahlbäck *et al.*, 1990), Fibuline (Roark *et al.*, 1995; Reinhardt *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 2002; Yanagisawa *et al.*, 2002), Osteopontin (Pasquali-Ronchetti und Baccarani-Contri, 1997), Emilin (Bressan *et al.*, 1993; Mongiat *et al.*, 2000), Proteoglykane wie Versikan (Isogai *et al.*, 2002) MAGP-2 (Gibson *et al.*, 1996) und andere Mikrofibrillen-assoziierte Proteine (Kobayashi *et al.*, 1989; Horrigan *et al.*, 1992; Abrams *et al.*, 1995).

4.2.3 Elastogenese

4.2.3.1 Das Tropoelastin-Gen

Das menschliche Gen, in dem Tropoelastin kodiert ist (ELN), befindet sich auf Chromosom 7 (7q11.23) (Fazio *et al.*, 1991; Hillier *et al.*, 2003). Es ist ca. 45 kb lang und besteht aus kleinen Exons, die sich zwischen sehr großen Introns befinden (Bashir *et al.*, 1989). Das Verhältnis von Introns zu Exons ist mit 20:1 außergewöhnlich hoch (Vrhovski und Weiss, 1998; Piontkivska *et al.*, 2004). Die Sequenz kodiert lediglich ca. 3,5 kb mRNA (Parks und Deak, 1990), von denen 2,5 kb translatiert werden, wohingegen ein ca. 1,0 kb großer Abschnitt vom 3'-Terminus untranslatiert bleibt (Rosenbloom, 1993). Das humane Tropoelastin-Gen beinhaltet 34 Exons (1 bis 33 und 36). Zwei weitere Exons (34 und 35), die in den Genomen anderer Säugetiere wie Maus, Kaninchen, Katze, Schwein und Rind vorhanden sind (Szabo *et al.*, 1999), gingen während der Evolution der Primaten in zwei Stufen verloren. Einzigartig für das menschliche Tropoelastin-Gen ist weiterhin das Vorhandensein des Exons 26A, das eine hydrophile Domäne kodiert und dessen Vorkommen bisher für keine andere Spezies beschrieben wurde (Indik *et al.*, 1987; Bashir *et al.*, 1989).

4.2.3.2 Alternatives Spleißen

Die Mehrzahl der menschlichen Gene wird in mehr als eine mRNA transkribiert, wodurch aus den nur ca. 20 000 bis 25 000 Genen (IHGSC, 2004) hunderttausende Proteine hergestellt werden. Nachdem die DNA eines Gens in pre-mRNA kopiert wurde, müssen die Introns entfernt und die Exons wieder zusammengefügt werden. Dieser Vorgang wird als Spleißen bezeichnet. Kommt es dabei zu Variationen, also beispielsweise zum Überspringen von Exons, handelt es sich um alternatives Spleißen. Einen Überblick über den derzeitigen Kenntnisstand des alternativen Spleißens und die verschiedenen auftretenden Formen gibt ein kürzlich von Blencowe veröffentlichter Artikel (Blencowe, 2006).

Die mRNA des Tropoelastins unterliegt einem ausgeprägten alternativen Spleißen, das durch das vollständige Fehlen von Exons oder aber durch das Fehlen von Teilen von Exons in Erscheinung tritt. Im Falle von humanem Tropoelastin sind mindestens acht verschiedene Exons (22, 23, 23A, 24, 26A, 30, 32 und 33) in das alternative Spleißen involviert (Indik et al., 1987; Fazio et al., 1988a; Indik et al., 1989; Parks und Deak, 1990; Zhang et al., 1999). Noch ist nicht vollständig geklärt, unter welchen Bedingungen die einzelnen Isoformen gebildet werden. Es gibt jedoch Erkenntnisse, nach denen die Vorgänge des alternativen Spleißens gewebeabhängig zu sein scheinen und offenbar mit entwicklungsbedingten Veränderungen der Zellen bzw. mit der Alterung des jeweiligen Individuums einhergehen. Dies äußert sich in der Ausbildung unterschiedlicher Verhältnisse der Isoformen und wurde für alle untersuchten Spezies inklusive des Menschen gefunden (Parks und Deak, 1990; Heim et al., 1991). Bisher sind elf verschiedene Isoformen von Tropoelastin bekannt (Indik et al., 1987; Fazio et al., 1988a; Fazio et al., 1988b; Li et al., 1997; Hillier et al., 2003; Gerhard et al., 2004; Ota et al., 2004). Bei den am häufigsten auftretenden Isoformen des Tropoelastins fehlt das Exon 26A, das offenbar nur bei bestimmten Erkrankungen, wie beispielsweise pulmonaler Hypertonie, exprimiert wird (Liptay et al., 1991; Debelle und Tamburro, 1999).

4.2.3.3 Expression und Sekretion von Tropoelastin

Die Elastogenese findet hauptsächlich während der fetalen und der frühen neonatalen Entwicklung statt. Tropoelastin wird von verschiedenen Zelltypen wie Muskelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Chondroblasten und Mesothelzellen synthetisiert und sezerniert (Uitto *et al.*, 1991; Mithieux und Weiss, 2005). Im Erwachsenenalter findet kaum noch Elastogenese statt. Kommt es zu einer Schädigung der elastischen Fasern, so kann die Synthese jedoch innerhalb kurzer Zeit wieder gestartet werden (Hoff *et al.*, 1999; Davidson, 2002). Das dabei entstehende Elastin ist jedoch von geringerer Qualität als das während des Wachstums gebildete.

Nach dem Spleißen verlässt die mRNA den Kern und durch die auf der Oberfläche des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER) stattfindende Translation wird das je nach Spleißvariante ca. 60 000 u bis 70 000 u große, hydrophobe Protein Tropoelastin

(Vrhovski und Weiss, 1998) gebildet, das zu etwa 75 % aus den Aminosäuren Gly, Ala, Pro und Val besteht. Das Protein ist größtenteils aus alternierenden hydrophoben und hydrophilen Domänen zusammengesetzt, wie das Hydrophobizitäts/Hydrophilitäts-Diagramm in Abbildung 8 verdeutlicht. Die hydrophoben Domänen sind für die elastischen Eigenschaften verantwortlich, wohingegen an den hydrophilen Lysin-reichen Domänen die Quervernetzung erfolgt (Rosenbloom *et al.*, 1991).



Abbildung 8: Diagramm zur Hydrophobizität/Hydrophilität von humanem Tropoelastin (Swiss-Prot Accession-Nummer <u>P15502</u>, Isoform <u>9</u>) berechnet nach Hopp und Woods (Hopp und Woods, 1981). Die hydrophilen Peaks sind überwiegend potenzielle Domänen für Quervernetzungen (Indik et al., 1987), die durch Aminosäuresequenzen der KA- und KP-Domänen mit den entsprechenden kodierenden Exons gekennzeichnet sind.

Am N-Terminus befindet sich ein aus 26 Aminosäuren bestehendes Signalpeptid, das abgespalten wird, sobald das Protein in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums eindringt (Grosso und Mecham, 1988). Danach wird es durch das Lumen in Richtung Golgi-Apparat transportiert. Bevor das Tropoelastin über Sekretvesikel aus der Zelle sezerniert wird, wird es mit einem Chaperon, dem ca. 67 000 u großen Elastin-bindenden Protein (EBP), versehen. Bei EBP handelt es sich um eine enzymatisch inaktive Spleißvariante von β -Galactosidase, die an hydrophobe Domänen des Tropoelastins, vorrangig an den Bereich VGVAPG, bindet (Mecham *et al.*, 1989). Das Chaperon verhindert die intrazelluläre Selbstaggregation des Tropoelastins und schützt es anscheinend vor enzymatischem Abbau durch Maskierung der Angriffsstellen der Proteasen (Hinek und Rabinovitch, 1994). Nach der Sekretion transportiert EBP das Tropoelastin zu dem fibrillären Netzwerk, in dem die Fasern gebildet werden. Durch Bindung von mikrofibrillären Galaktozuckern an das EBP wird das Tropoelastin schließlich freigesetzt (Privitera *et al.*, 1998). Danach wird das EBP zurückgewonnen und wieder in die intrazellulären endosomalen Kompartimente aufgenommen, wo es an neu synthetisiertes Tropoelastin bindet (Hinek, 1995).

4.2.3.4 Posttranslationale Modifikationen

Neben der Umwandlung von Lysin zu Allysin in Tropoelastin (siehe 4.2.3.5) ist als weitere posttranslationale Modifikation die Hydroxylierung von Prolin in Tropoelastin beschrieben. Außerdem wird zu einem sehr geringen Anteil Hydroxyprolin (Hyp) direkt eingebaut (Bentley und Hanson, 1969).

Die Hydroxylierung findet vermutlich wie im Falle des Kollagenvorläufers Prokollagen im endoplasmatischen Retikulum statt und wird dort durch das Enzym Prolylhydroxylase (EC 1.14.11.2) katalysiert (Uitto *et al.*, 1976). Es ist zwischen der 3- und 4-Prolylhydroxylase zu unterscheiden, die für die Bildung der beiden in Abbildung 9 gezeigten Isomere 3- und 4-Hydroxyprolin verantwortlich sind. Während für Kollagen die Bedeutung des 4-Hydroxyprolins in der Stabilisierung der Tripelhelixstruktur liegt (Berg und Prockop, 1973), ist die Funktion von 3-Hydroxyprolin bisher weitgehend unbekannt und Gegenstand von Untersuchungen (Jenkins *et al.*, 2003; Mizuno *et al.*, 2004).



Abbildung 9: 3- und 4-Hydroxyprolin.

Wie zuvor erwähnt, wurden Untersuchungen zum Gehalt der einzelnen Aminosäuren in Elastin in der Vergangenheit anhand von Aminosäureanalysen nach saurer Hydrolyse durchgeführt. Dabei konnte auch 4-Hydroxyprolin nachgewiesen werden. Für verschiedene Spezies wurden Hydroxylierungsgrade zwischen 0 % und 33 % beschrieben (Bentley und Hanson, 1969; Sandberg *et al.*, 1969; Smith *et al.*, 1972; Starcher und Galione, 1976; Uitto

et al., 1976; Dunn und Franzblau, 1982). Allerdings war es mit den in diesen Arbeiten eingesetzten Methoden nicht möglich, die Positionen der Prolinreste zu ermitteln, an denen die Hydroxylierung stattfindet. Weiterhin ist nicht untersucht worden, ob es sich ausschließlich um 4-Hydroxyprolin handelt. In einem Artikel von Vrhovski und Weiss wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass es sich bei den Ergebnissen zur Prolinhydroxylierung um Artefakte handeln könnte, die auf Verunreinigungen des Elastins mit Kollagen zurückgehen (Vrhovski und Weiss, 1998). Dies kann aber unter Berücksichtigung einer Arbeit aus dem Jahr 1969, in der die Autoren eine Kontamination durch Kollagen ausschließen konnten, als unwahrscheinlich betrachtet werden (Bentley und Hanson, 1969).

Anders als bei Kollagen, bei dem die Hydroxylierung essentieller Bestandteil der Biosynthese ist (Uitto und Lichtenstein, 1976), ist die Anwesenheit von Hyp für die Synthese und Sekretion von Tropoelastin nicht erforderlich (Rosenbloom und Cywinski, 1976). Kommt es jedoch zu einer überhöhten Hydroxylierung, kann dies Auswirkungen auf die Stabilität der Sekundärstruktur des Tropoelastins haben, woraus die Inhibierung der Koazervation und Quervernetzung der Tropoelastinmoleküle und damit schließlich eine gestörte Bildung der elastischen Fasern resultieren kann (Urry *et al.*, 1979).

4.2.3.5 Koazervation und Quervernetzung von Tropoelastin

Die Koazervation ist ein essentieller Bestandteil der Elastogenese. Tropoelastin ist bei geringen Temperaturen löslich, beginnt aber bei Erhöhung in den physiologischen Temperaturbereich selbständig zu aggregieren. Der Vorgang, bei dem sich die Tropoelastinmoleküle ausrichten und dadurch die nachfolgende Quervernetzung untereinander erst ermöglichen, beginnt bei Temperaturen oberhalb von 20 °C und ist vollständig reversibel. Die optimalen Bedingungen für die Koazervation sind auf die physiologischen Eigenschaften der extrazellulären Matrix eingestellt (Urry, 1978; Vrhovski *et al.*, 1997). Die aggregierenden Moleküle ordnen sich aufgrund von Interaktionen zwischen den hydrophoben Domänen an, zu denen beispielsweise die sich wiederholenden Sequenzabschnitte GVGVP, GGVP und GVGVAP gehören (Vrhovski und Weiss, 1998). Diese Anlagerung der Tropoelastinmoleküle geschieht nicht zufällig, sondern ihre Orientierung wird durch die Mikrofibrillen genau vorgegeben.

Nach Anlagerung von Tropoelastin kommt es zu kovalenter Quervernetzung zwischen den Molekülen. Wie auch im Falle von Kollagen wird diese durch die kupferabhängige, auch bei hohen Temperaturen stabile Aminoxidase Lysyloxidase (EC 1.4.3.13) initiiert. In einer ersten, durch dieses Enzym katalysierten Reaktion werden Lysinreste durch oxidative Desaminierung der ε -Aminogruppe in Allysine (α -Aminoadipin- δ -semialdehyd) umgewandelt (Kagan und Sullivan, 1982; Kagan und Cai, 1995). In den folgenden, spontan stattfindenden Kondensationsreaktionen verbindet sich das Allysin mit benachbarten Allysin- oder unveränderten Lysinresten. Dabei entstehen aus zwei Aminosäureresten Allysinaldol und Lysinonorleucin sowie aus drei Resten Merodesmosin. Die ausschließlich in Elastin vorkommenden quervernetzten Aminosäuren Desmosin und sein Isomer Isodesmosin werden aus drei Allysinresten und einem Lysinrest gebildet. Sie verbinden jedoch jeweils nur zwei Tropoelastinmoleküle miteinander (Partridge *et al.*, 1964; Foster *et al.*, 1974; Vrhovski und Weiss, 1998; Umeda *et al.*, 2001).

In Tropoelastin existieren zwei Domänen für die Quervernetzung. Diese Domänen beinhalten entweder mehrere Alanin- (KA) oder Prolinreste (KP) (siehe Abbildung 8). In den KA-Regionen befinden sich die Lysinreste immer in Gruppen von zwei oder drei Aminosäuren, die durch zwei oder drei Alaninreste voneinander getrennt sind. Diese Regionen liegen höchstwahrscheinlich in Form von α -Helices vor, die die Bildung von Desmosin und Isodesmosin begünstigen. Die Lysinpaare in den KP-Domänen sind durch einen oder mehrere Prolinreste getrennt und werden von hydrophoben Aminosäuren begrenzt (Brown-Augsburger *et al.*, 1995). Die Ausbildung von Desmosin und Isodesmosin wurde nur für KA-, nicht aber für KP-Domänen beobachtet. Dies hängt vermutlich mit dem Vorhandensein der Proline zusammen, die höchstwahrscheinlich die Bildung einer α -helikalen Struktur verhindern.

Es gibt nur wenige Erkenntnisse darüber, welche Lysinreste tatsächlich in die Bildung der Quervernetzung involviert sind. Brown-Augsburger *et al.* identifizierten allerdings eine Domäne, in der drei Tropoelastinmonomere miteinander verbunden sind. Dies geschieht durch Bildung einer Desmosin-Quervernetzung an jeweils zwei Lysinresten der KA-Domänen der Exons 19 und 25. Diese beiden Domänen sind die einzigen, in denen drei Lysine kodiert sind (vgl. Abbildung 8). Der verbleibende Lysinrest an jeder der beiden Domänen bildet über ein Lysinonorleucin eine Quervernetzung zu jeweils einem der zwei Lysinreste der im Exon 10 kodierten KP-Domäne einer weiteren Tropoelastineinheit (Brown-Augsburger *et al.*, 1995).

4.3 Ergebnisse und Diskussion

4.3.1 Einsatz komplementärer massenspektrometrischer Techniken zur Analyse der Peptide von rekombinantem Tropoelastin (Anhang 9.4: Getie *et al.* 2005b)

In dieser Studie wurden Peptide von humanem Tropoelastin mittels verschiedener massenspektrometrischer Fragmentierungsexperimente untersucht. Es wurde das Ziel verfolgt, durch Einsatz komplementärer Techniken eine möglichst vollständige Sequenzabdeckung zu erreichen.

Dazu wurde humanes Tropoelastin (P15502, Isoform 2), das rekombinant durch Expression eines synthetisch hergestellten Tropoelastin-Gens in *Escherichia Coli* nach Martin *et al.* hergestellt wurde (Martin *et al.*, 1995), mit den Proteasen Chymotrypsin und Pepsin gespalten. Die resultierenden Peptidgemische wurden Tandem-MS-Experimenten mittels HPLC/ESI an einer Quadrupol-Ionenfalle und statischer Nano-ESI an einem qTOF-Instrument sowie PSD-Experimenten an einem MALDI-TOF-Gerät nach vorheriger HPLC-Fraktionierung unterzogen. Die prozessierten Fragmentspektren wurden dann durch datenbankbasierte Sequenzierung, *de novo*-Sequenzierung sowie durch Kombination beider Methoden identifiziert.

Die Untersuchung des peptischen Verdaus erfolgte wegen der überwiegend kurzkettigen Peptide mittels Tandem-Massenspektrometrie an LC/ESI sowie an statischer Nano-ESI. 100 Peptide mit Längen zwischen 4 und 54 Aminosäuren wurden identifiziert, 29 davon mit beiden Methoden. Die Sequenzabdeckung betrug 86,7 %.

Bei dem Verdau mit Chymotrypsin entstanden im Vergleich zu dem peptischen Verdau weniger und dafür größere Peptide. Dies resultiert aus der im Vergleich zu Pepsin höheren Spezifität des Chymotrypsins. Der chymotryptische Verdau wurde mittels Nano-ESI-Tandem-MS und LC/MALDI-TOF-PSD untersucht. Insgesamt wurden 49 verschiedene Peptide mit Längen zwischen 6 und 59 Aminosäuren sequenziert. Neben den für Chymotrypsin typischen Spaltstellen C-terminal von Phe, Leu und Tyr (Folk und Cole, 1965)^g wurden zahlreiche Spaltungen C-terminal von Lys und Arg nachgewiesen, die für Trypsin charakteristisch sind. Bei der Untersuchung des eingesetzten Enzyms mit MALDI-TOF

^g Chymotrypsin spaltet bevorzugt auch an Trp, das aber nicht Bestandteil der Tropoelastinsequenz ist.

wurde zudem ein der Molekülmasse des Trypsins entsprechender Peak gefunden, womit auf eine Verunreinigung des Chymotrypsins mit Trypsin geschlossen werden konnte. Dies war allerdings für diese Untersuchung eher förderlich als nachteilig, da mit Chymotrypsin allein noch größere Peptide und folglich weniger Peptide entstanden wären.

Die Sequenzabdeckung betrug bezogen auf die Isoform 2 des Tropoelastins exklusive des Signalpeptids und ohne Berücksichtung nicht eindeutig zuordenbarer Peptide 84,7 %. Lediglich neun der mit beiden Methoden identifizierten Peptide waren identisch.



Abbildung 10: Zahl der identifizierten Peptide und Sequenzabdeckung in Prozent für die Proteolyse mit Pepsin und Chymotrypsin/Trypsin sowie der jeweils verwendeten massenspektrometrischen Methode.

Die identifizierten und zuordenbaren Peptide innerhalb der Tropoelastinsequenz sind in Abbildung 1 und 2 in Anhang 9.4 kenntlich gemacht. Die jeweils ermittelte Zahl der Peptide, die durch Einsatz der beiden Enzyme und der drei massenspektrometrischen Methoden erhalten wurde, sowie die aus ihnen ermittelten Sequenzabdeckungen sind in Abbildung 10 dargestellt.

Es wird ersichtlich, dass bei Verwendung einer einzelnen Methode an nur einem Verdau Sequenzabdeckungen von lediglich 42,8 % bis zu 78,9 % erzielt werden konnten. Erst durch die Kombination der Ergebnisse der drei massenspektrometrischen Methoden, die zur Analytik der beiden Verdaue angewendet wurden, konnte eine Sequenzabdeckung von 94,4 % erreicht werden. Die fehlenden Sequenzabschnitte können insbesondere dadurch erklärt werden, dass einige der identifizierten Peptide aufgrund des mehrfachen Vorkommens innerhalb der Tropoelastinsequenz nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Zudem wurden einzelne Aminosäuren detektiert, insbesondere Ala und Lys, die in den nicht wiedergefundenen Regionen besonders häufig vorkommen.

4.3.2 Untersuchung der Primärstruktur des humanen Hautelastins (Anhang 9.5: Schmelzer *et al.* 2005 und Anhang 9.6: Getie *et al.* 2005a)

Für den enzymatischen Abbau des Elastins eignen sich spezifische Proteasen wie Trypsin oder Chymotrypsin nur sehr bedingt (Werb *et al.*, 1982). Trypsin spaltet sehr spezifisch C-terminal von Arg und Lys, sofern der nächste Rest kein Pro ist (Olsen *et al.*, 2004). In Elastin gibt es wenige Arg-, jedoch viele Lys-Reste. Die meisten Lys-Reste liegen allerdings modifiziert in Quervernetzungen vor, weswegen sie für Spaltungen nicht zur Verfügung stehen. Brown-Augsburger *et al.* haben dieses Problem teilweise umgehen können, indem sie durch induzierten Kupfermangel die Wirkung der Lysyloxidase und damit die Quervernetzung im Elastin der Schweineaorta gehemmt haben, wodurch dieses besser mit Trypsin und Chymotrypsin gespalten werden konnte (Brown-Augsburger *et al.*, 1995). Allerdings bleibt der N-Terminus für Trypsin problematisch, da in diesem Bereich auf viele der Lys ein C-terminales Pro folgt.

Um derartige Probleme zu vermeiden, wurde in dieser Arbeit der Ansatz verfolgt, Elastin mithilfe unspezifischer Proteasen zu verdauen. Humanes Hautelastin, das nach einer von Starcher und Galione beschriebenen Methode gewonnen wurde (Starcher und Galione, 1976), wurde mittels der drei Enzyme Pepsin (EC 3.4.23.1) aus der Magenschleimhaut des Schweins (Ryle, 1970), Thermitase (EC 3.4.21.66) aus *Thermoactinomyces vulgaris* (Schalinatus *et al.*, 1979) und Elastase (EC 3.4.21.36) aus dem Pankreas des Schweins (Shotton, 1970) hydrolysiert. Allen drei Endopeptidasen ist gemein, dass sie ihre Substrate sehr unspezifisch spalten und für sie die Fähigkeit beschrieben wurde, Elastin abbauen zu können (Collins und Fine, 1981; Kleine, 1982).

Aus Voruntersuchungen an bovinem Hautelastin (unveröffentlichte Daten) wurde ersichtlich, dass aufgrund der Quervernetzungen und der daraus resultierenden Unlöslichkeit des Proteins die Proteolysen sehr langsam ablaufen. Die Elastinprobe, die in der entsprechenden Pufferlösung bzw. im Falle des peptischen Verdaus in HCl-Lösung dispergiert vorlag, wurde daher nach Zugabe des jeweiligen Enzyms über 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden dann einer Charakterisierung mit HPLC/ESI-MS/MS an einer Quadrupol-Ionenfalle sowie statischer Nano-ESI-MS/MS an einem qTOF-Analysator unterzogen.

4.3.2.1 Charakterisierung der Peptide

Insgesamt wurden in den drei Elastinverdauen 278 Peptide sequenziert, von denen 254 unterschiedliche Sequenzen aufwiesen. Davon konnten 25 Peptide aufgrund des mehrfachen Vorkommens in der Tropoelastinsequenz nicht eindeutig zugeordnet werden, so z.B. das Peptid VAPGVGVAPGVGVAPG, bei dem es sich um HTEL 514-529^h oder HTEL 538-553 handeln könnte. In Abbildung 11 ist die Anzahl der identifizierten Peptide in Abhängigkeit ihrer Kettenlänge für die jeweilige Protease dargestellt.



Abbildung 11: Anzahl der identifizierten Peptide für die eingesetzten Proteasen Elastase (insges. 117 Peptide), Thermitase (insges. 89 Peptide) und Pepsin (insges. 72 Peptide) in Abhängigkeit ihrer Kettenlänge.

Daraus geht hervor, dass der Verdau mit Thermitase besonders effektiv war, also vor allem viele kleine Peptide im Bereich von sechs bis zehn Aminosäuren entstanden. Bei Elastase und insbesondere bei Pepsin wurde eine breitere Größenverteilung der Peptide festgestellt. Die identifizierten Bereiche, die auf Tropoelastin bezogen wurden, sind in Abbildung 12 hervorgehoben, wohingegen die Peptide der Abbildung 1 des Anhangs 9.5 und der Tabelle 1 des Anhangs 9.6 entnommen werden können. Alle drei Proteasen spalteten C-terminal von den in Tropoelastin am häufigsten vorkommenden Aminosäuren (außer Pro) Gly, Val,

^h Allen Angaben zu Positionen von Aminosäuren des Tropoelastins liegen die Sequenz der Isoform 9 und eine das Signalpeptid einschließende Zählweise zu Grunde.

Protease	Spaltstellen (C-terminal von)	
Elastase	$\mathbf{G}, \mathbf{V}, \mathbf{A}, \mathbf{L}, \mathbf{I}, F, P, E, R$	Tabelle 2: Spaltstellen der zum Verdau
Thermitase	$\mathbf{G}, \mathbf{V}, \mathbf{A}, \mathbf{L}, \mathbf{F}, P, T, E, Q, K$	des humanen Elastins eingesetzten
Pepsin	$\mathbf{G}, \mathbf{V}, \mathbf{A}, \mathbf{L}, \mathbf{F}, Y, S, T, I, D$	kursiv – seltenere Spaltstellen).

Ala und Leu. Die identifizierten Spaltstellen der drei Enzyme sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Aus der Vereinigung aller Daten wurde eine Sequenzabdeckung von ca. 73,7 % ermittelt. Nicht wiedergefundene Bereiche stammen insbesondere aus den KA-Domänen, wie z.B. den Abschnitten AAAKAAK (in Exon 27 kodiert), AAAKAAKAA (kodiert in Exon 29) und teilweise aus KP-Domänen, wie beispielsweise KPGKVPGV (in Exon 8 und 9 kodiert). Die Lys dieser Domänen sind – wie in 4.2.3.5 beschrieben – teilweise in Quervernetzungen wie Lysinonorleucin, Allysinaldol, Merodesmosin, Desmosin und Isodesmosin involviert. Eine Identifikation von Peptiden, die solche Quervernetzungen beinhalten, war mit den in dieser Studie verwendeten Methoden nicht möglich.

4.3.2.2 Identifikation der Prolinhydroxylierungen in humanem Hautelastin

Die Hydroxylierung des Prolins in humanem Hautelastin konnte eindeutig nachgewiesen werden, indem insgesamt 43 Peptide identifiziert wurden, die eine oder zwei Prolinhydroxylierungen aufwiesen. Aus diesen Daten konnten 33 Positionen potenzieller Prolinhydroxylierungen ermittelt werden.ⁱ Mindestens eine weitere Position geht aus einem identifizierten Nonapeptid mit der Sequenz GVpGLGVGA hervor, die aber nicht eindeutig zugeordnet werden konnte, da diese Sequenz an zwei aufeinanderfolgenden Positionen des Tropoelastins (HTEL 593-601 und HTEL 602-610) lokalisiert ist.

Wie aus Abbildung 12 hervorgeht, wurden Hydroxyproline über die gesamte Tropoelastinsequenz verteilt gefunden. Geht man von einer Gesamtzahl von 91 Prolinen je Tropoelastinmolekül^j aus, entspricht dies einem maximalen Hydroxylierungsgrad von ca. 37,4 %. Allerdings wurden für beinahe alle Positionen der Hydroxyproline auch unmodifizierte

ⁱ Die Positionen partieller Prolinhydroxylierung wurden in die Swiss-Prot-Datenbank aufgenommen.

^j Bezogen auf die Isoform <u>9</u> der Tropoelastinsequenz <u>P15502</u>, jedoch ohne Signalpeptid und die durch Exon 26A kodierten Aminosäuren.

Prolinreste nachgewiesen, woraus geschlussfolgert werden kann, dass es sich bei der Prolinhydroxylierung von Tropoelastin um eine partielle Modifikation handelt.

1 <u>0</u>	2 <u>0</u>	3 <u>0</u>	4 <u>0</u>	5 <u>0</u>	6 <u>0</u>
MAGLTAAAPR	PGVLLLLSI	LHPSRPGGVP	GAI pGGVPGG	VFYPGAGLGA	LGGGALGPGG
7 <u>0</u> KP LKpVpGGL	AGAGLGAGLG	9 <u>0</u> AFPAVTF <mark>P</mark> GA	2 10 <u>0</u> LVPGGVADAA	3- 11 <u>0</u> AAYKA AKAGA	12 <u>0</u> GL GGVpGVGG
13 <u>0</u> LGVSAG AVVP	5 14 <u>0</u> QPGAGV KPGK	15 <u>0</u> VPGV GLPGVY	6 16 <u>0</u> PGGVLpGARF	17 <u>0</u> PGVGVLpGVp	7 18 <u>0</u> TGAGVKPKAP
190	200	21 <u>0</u>	22 <u>0</u>	230	24 <u>0</u>
GVGGAFAGIp	GVGPFGGPQP	GVPLGYPIKA	PKLPGGYGLP	YTTGKLPYGY	GPGGVAGAAG
25 <u>0</u>	26 <u>0</u>	27 <u>0</u>	28 <u>0</u>	29 <u>0</u>	30 <u>0</u>
KAGYPTGT GV	GPQAAAAAAA	KAAAKF GAGA	AGVLPGVGGA	GVpGVpGAIp	GIGGIAGVGT
31 <u>0</u>	32 <u>0</u>	33 <u>0</u>	34 <u>0</u>	35 <u>0</u>	36 <u>0</u>
РААААА АААА	AKA AKYGAAA	GLVPGGpGFG	PGVVGVPGAG	VpGVGVpGAG	IpVVpGAGIp
37 <u>0</u> GAAVPGVVSP	38 <u>0</u> EAAAKA AAKA	39 <u>0</u> AK YGARPGVG	40 <u>0</u> VGGIPTYGVG	41 <u>0</u> AGGFPGFGVG 20	42 <u>0</u> VGGI <mark>p</mark> GVAGV
(G) 43 <u>0</u> pSVGGVpGVG	440 GVPGVGISPE	45 <u>0</u> AQA AAAAKAA 21	46 <u>0</u> KYGAAGAGVL	47 <u>0</u> GGLVpGpQAA 22	480 VPGVPGTGGV
49 <u>0</u>	50 <u>0</u>	51 <u>0</u>	52 <u>0</u>	53 <u>0</u>	54 <u>0</u>
pGVGTPAAAA	AKAAAKAAQF	ALL NLAGLVP	GVGVAPGVGV	APGVGVApGV	GLAPGVGVAP
55 <u>0</u>	56 <u>0</u>	57 <u>0</u>	58 <u>0</u>	59 <u>0</u>	60 <u>0</u>
GVGVAPGVGV	APGIG <mark>p</mark> GGVA	AAAKSAAKVA	AKAQLRA AAG	LGAGIpGLGV	GVGVPGLGVG
61 <u>0</u> AGVPGLGVGA	62 <u>0</u> GVpGFGAGAD	63 <u>0</u> EGVRRSLSPE	64 <u>0</u> LREGDPSSSQ 26A	65 <u>0</u> HLPSTPSSPR	66 <u>0</u> VpGAL AAAKA
67 <u>0</u>	680	69 <u>0</u>	70 <u>0</u>	710	72 <u>0</u>
AK YGAAVPG V	L GGLGALGGV	GIpGGVVGAG	PAAA AAAKA	AAKAA QFGLV	GAAGLGGLGV
730 GGLGVPGVGG	74 <u>0</u> LGGIPPAAAA 31-	750 KAAKYGAA GL	760 GGVLGGAGQF 32	77 <u>0</u> PLGGVAARPG	78 <u>0</u> FGLSpIFpGG
79 <u>0</u> ACLGKACGRK	RK				*

Abbildung 12: Aminosäuresequenz von humanem Tropoelastin (<u>P15502</u>, Isoform <u>9</u>) mit Kennzeichnung der die Aminosäuren kodierenden Exons (rot – Exons, die in der Hautelastin kodierenden mRNA ausgespleißt sein können; blau – sonstige Exons). Das Signalpeptid ist kursiv und Bereiche, aus denen Peptide identifiziert wurden, sind fettgedruckt dargestellt. Prolinreste, die in mindestens einem der identifizierten Peptide hydroxyliert vorlagen, sind mit "p" gekennzeichnet.

So wurden beispielsweise mehrere Peptide gleicher Sequenz parallel detektiert, die sich nur durch eine OH-Gruppe an einem der Pro unterschieden. Beispiele sind das Peptidpaar GVPGAGVPGVGVPGAGIPVVPG und GVPGAGVpGVGVPGAGIPVVPG (HTEL 335-356) des Elastaseverdaus oder die beiden Peptide AGIPGVGPF und AGIpGVGPF (HTEL 281-293), die nach der Proteolyse mit Thermitase identifiziert wurden.

Annotierte Fragmentspektren dieser Peptidpaare sind in Abbildung 2 in Anhang 9.6 sowie in Abbildung 2 in Anhang 9.5 gegenübergestellt. Der Hydroxylierungsgrad des Elastins kann aus den Daten dieser Experimente nicht genau bestimmt werden. Da jedoch für die meisten Positionen einer Prolinhydroxylierung auch Peptide mit Pro nachgewiesen wurden, muss der durchschnittliche Hydroxylierungsgrad deutlich unterhalb der ermittelten maximalen 37,4 % liegen.

4.3.2.3 Ergebnisse zur Isoform des Hautelastins

Aus Untersuchungen von cDNAs des humanen Tropoelastins ist bekannt, dass es durch alternatives Spleißen verursachte Variationen in den Nukleotidsequenzen einer Spezies gibt (Fazio *et al.*, 1988a; Fazio *et al.*, 1988b; Pierce *et al.*, 1990).

So wurde das Vorhandensein des Exons 26A in der Tropoelastin kodierenden mRNA fetaler Aortenzellen nachgewiesen (Indik *et al.*, 1987), wohingegen es in der mRNA der Fibroblasten der Haut ausgespleißt ist (Fazio *et al.*, 1988a). Das Fehlen der durch das Exon 26A exprimierten Aminosäuren (HTEL 618-650) in Hautelastin konnte eindeutig verifiziert werden. Einerseits konnten keine Peptide aus diesem Teil des Proteins nachgewiesen werden, zum anderen wurden vier Peptide identifiziert, die das Nichtvorhandensein dadurch belegen, dass sie Sequenzen aufweisen, die aus dem C-Terminus der von Exon 26 kodierten Aminosäuresequenz sowie dem N-Terminus des von Exon 27 kodierten Sequenzabschnitts bestehen (siehe Abbildung 13).



Abbildung 13: Sequenzabschnitt von humanem Tropoelastin. Die farbigen Unterstreichungen kennzeichnen vier identifizierte Peptide, die belegen, dass die Aminosäuren des kodierenden Exons 26A in Hautelastin nicht exprimiert werden.

Bei diesen Peptiden handelt es sich um AVpGAL ($m_m = 542,31$ u) aus dem Verdau mit Thermitase, GAVPGAL ($m_m = 583,33$ u), das im Pepsinverdau nachgewiesen wurde, sowie zwei Spaltprodukte der Proteolyse mit Elastase, GVPGFGAVPG ($m_m = 856,44$ u) und GAGVPGFGAVPG ($m_m = 984,50$ u).

In einer Arbeit von Fazio *et al.* wurde für Hautelastin das zusätzliche, sechs Aminosäuren (ALLNLA, HTEL 501-506) kodierende Exon 23A beschrieben (Fazio *et al.*, 1988a). Das Vorhandensein dieses Sequenzabschnitts konnte durch die Identifizierung der Peptide NLAGL (HTEL 504-508), AGLVPGVGVAPGVGVAPG (HTEL 506-523) und AGLVPGVGVAPGVGVAPGVG (HTEL 506-525) bestätigt werden. Diese Peptide wurden durch Proteolyse mit Elastase gewonnen.

Für cDNA des humanen Hautelastins wurde weiterhin das Fehlen des Exons 22 berichtet (Fazio *et al.*, 1988a). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurden drei Peptide identifiziert, die die Anwesenheit der in Exon 22 kodierten Aminosäuren (HTEL 453-481) für das von uns untersuchte Hautelastin belegen. Dabei handelt es sich um die Peptide GGLVpGpQAAVPGVPG (HTEL 461-476), GGVpGVGTPAA (HTEL 478-488) und GLVpGp (HTEL 462-467), die durch proteolytische Spaltung mit Pepsin und Thermitase erhalten wurden (siehe Abbildung 1 in Anhang 9.5). Aus Bereichen, die durch die Exons 23, 32 und 33 exprimiert werden, konnten ebenfalls Peptide nachgewiesen werden (siehe Abbildung 12). Ein partielles Fehlen dieser Exons wurde für Tropoelastin-cDNA aus Fibroblasten der Haut festgestellt (Fazio *et al.*, 1988a; Holzenberger *et al.*, 1993).

Weiterhin wurden drei Peptide identifiziert, die sich keiner der elf Isoformen der Tropoelastinsequenz <u>P15502</u> zuordnen ließen. Die Peptide wurden jedoch anhand der Sequenz eines hypothetischen Proteins, die der Charakterisierung humaner cDNA entstammt (Ota *et al.*, 2004), identifiziert. Die Aminosäuresequenz des kodierten Proteins enthält 472 Aminosäuren und wird in der TrEMBL-Datenbank unter der Accession-Nummer <u>Q8N2G0</u> geführt. Sie weist große Übereinstimmung mit der Tropoelastinsequenz auf. Es fehlen jedoch Aminosäuren einiger kodierender Exons und es gibt einige Variationen in der Sequenz. Eine dieser Variationen betrifft die Aminosäure in Position 422, die in <u>P15502</u> als Ser, in <u>Q8N2G0</u> jedoch als Gly vorliegt. Diese auch von Hillier *et al.* beschriebene Variation (Hillier *et al.*, 2003) wurde anhand der Peptide mit den Sequenzen GVPGVGG-VPGVGGVPGVG, GVPGVGGVPGVGGVPGVGI und GVPGVGGVPGVGGVPG- VGISPE nachgewiesen. Das größte dieser drei Peptide ist in Abbildung 14 dem entsprechenden Abschnitt der Sequenz <u>P15502</u> gegenübergestellt.

Peptid:1 GVPGVGGVPGVGGVPGVGISPE22Match:GVP VGGVPGVGGVPGVGISPEP15502:419 GVPSVGGVPGVGGVPGVGISPE440

Abbildung 14: Eines von drei identifizierten Peptiden aus humanem Hautelastin, das gegenüber der Tropoelastinsequenz <u>P15502</u> eine Variation in einer Aminosäure aufweist ($S \rightarrow G$).

Es wurden allerdings auch Peptide mit Ser an Position 422 identifiziert, woraus geschlussfolgert werden kann, dass das untersuchte Elastin verschiedene Tropoelastinvorläufer beinhaltete. Aus dem Vergleich der ermittelten Sequenzdaten mit den verschiedenen Isoformen der Tropoelastinsequenz <u>P15502</u> ergab sich die höchste Übereinstimmung mit der Isoform <u>10</u>.

5 ZUSAMMENFASSUNG

5.1 Verdaustudien an β-Casein

Entsprechend der Zielstellung des ersten Teils dieser Arbeit galt es, am Beispiel des Nahrungsproteins β -Casein die Proteinverdauung im Magen *in vitro* nachzuvollziehen. Die Schwerpunkte lagen dabei auf der Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Hydrolyse, der Ermittlung der Spaltstellen des Enzyms Pepsin sowie dem Verbleib von Bereichen des β -Caseins, in denen bioaktive Peptide in inaktiver Form vorliegen. Dazu wurden gastroanaloge Proteolysen mit Pepsin an β -Casein durchgeführt und dessen Spaltprodukte zur Sequenzierung Fragmentierungsexperimenten mit ESI-, Nano-ESI- sowie MALDI-Massenspektrometrie unterzogen. Die Identifikation der Peptide erfolgte mittels datenbankgestützter sowie *de novo*-Sequenzierung.

Durch die Identifikation von insgesamt 138 unterschiedlichen Peptiden, darunter drei Phosphopeptide, wurde eine vollständige Sequenzabdeckung erreicht. Die Peptide wiesen mit Kettenlängen zwischen 2 und 84 Aminosäuren bzw. zwischen 218 u und 9304 u eine äußerst breite Größenverteilung auf. Aus den Ergebnissen der zeitlichen Studie geht hervor, dass die ca. 60 min andauernde Proteolyse am C-Terminus des Proteins beginnt. Mit zunehmender Inkubationszeit wurde zudem eine Abnahme der Spezifität des Pepsins beobachtet. An den 61 identifizierten Schnittstellen wurde partiell gespalten, woraus sich die hohe Zahl entstandener Peptide ergibt. Während für einige Bereiche des β-Caseins, in denen bioaktive Peptide kodiert sind, gezeigt werden konnte, dass sie einen Verdau mit Pepsin überstehen können, muss für andere das unbeschadete Überdauern des Verdaus im Magen als eher unwahrscheinlich eingeschätzt werden.

Auf Proteinebene wurde erstmals ein Aminosäureaustausch an Position 93 (Met \rightarrow Leu) nachgewiesen, der neue Beweise für die Existenz einer weiteren genetischen Variante des β -Caseins erbringt. Diesem Aminosäureaustausch liegt eine bereits publizierte Punktmutation im β -Casein-Gen zu Grunde. Es konnte der Bezug zu einer weiteren Arbeit hergestellt werden, in der die bisher nicht klassifizierte Nukleotidsequenz dieser Variante ermittelt worden war. Es wird vorgeschlagen, diese elfte Variante als β -Casein I zu bezeichnen.

Ferner wurde ein auf der Quarzmikrobalance basierendes Verfahren vorgestellt, mit dem sich Proteolysen in Echtzeit verfolgen lassen. Am Beispiel der mit zwei verschiedenen Enzymen durchgeführten Hydrolysen des auf Quarzsensoren immobilisierten β -Caseins konnte demonstriert werden, dass sich durch die Messung der Änderungen von Resonanzfrequenz und Dämpfung kleinste Veränderungen an der Proteinbeschichtung sehr empfindlich detektieren lassen. Auf diese Weise ist es möglich, die Einflüsse verschiedener Reaktionsbedingungen auf die Dauer und Effektivität enzymatischer Degradationen zu untersuchen und diese entsprechend zu optimieren.

5.2 Strukturuntersuchungen an Elastin

Im zweiten Teil der Arbeit galt es, neue Methoden zu entwickeln, die Untersuchungen zur Primärstruktur des unlöslichen Faserproteins Elastin ermöglichen. Die Experimente wurden an dem rekombinant hergestellten, löslichen Vorläuferprotein Tropoelastin sowie an humanem Elastin der Haut durchgeführt. Dazu wurden die Proteine zunächst mithilfe der Proteasen Chymotrypsin und Pepsin bzw. Thermitase, Pepsin und Elastase über eine Dauer von bis zu 24 h hydrolysiert. Mit Tandem-Massenspektrometrie-Experimenten unter Nutzung von konventionellem Elektrospray an einer Quadrupol-Ionenfalle, Nanoelektrospray an einem Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer sowie Post-Source-Decay-Experimenten an einem MALDI-Flugzeit-Massenspektrometer wurden Fragmentspektren der entstandenen Peptide aufgenommen und diese mithilfe von Proteindatenbanken identifiziert sowie *de novo* sequenziert.

Charakterisierung der Peptide von rekombinantem humanem Tropoelastin

Die Methoden wurden an rekombinantem Tropoelastin nach Verdau mit Chymotrypsin und Pepsin evaluiert. Durch die Kombination verschiedener Ionisationstechniken und Sequenzierungsverfahren konnten für den Chymotrypsinverdau 49 Peptide und für den Pepsinverdau 100 Peptide sequenziert werden. Die aus diesen Daten resultierende Sequenzabdeckung betrug 94,4 %.

Charakterisierung der Peptide von humanem Hautelastin

Es konnte gezeigt werden, dass unlösliches Elastin aus der Haut durch Einsatz verschiedener Proteasen breiter Spezifität effektiv gespalten werden kann. Die verwendeten Enzyme Pepsin, Thermitase und Elastase spalteten dabei überwiegend C-terminal von vier der fünf häufigsten Aminosäuren des Tropoelastins: Gly, Ala, Val und Leu. Insgesamt wurden 254 verschiedene Peptidsequenzen ermittelt, mit denen eine auf das Vorläuferprotein Tropoelastin bezogene Sequenzabdeckung von 73,7 % erreicht werden konnte. Die nicht wiedergefundenen Sequenzabschnitte sind zum überwiegenden Teil in Domänen potenzieller Quervernetzungen lokalisiert.

In der Literatur ist für die Hautelastin kodierende mRNA die partielle Abwesenheit mehrerer Exons beschrieben worden. Auf Proteinebene konnte in dieser Arbeit das Fehlen der durch Exon 26A exprimierten Aminosäuren eindeutig bestätigt werden. Dies gelang durch die Identifikation mehrerer Peptide, die aus Aminosäuren bestehen, die durch die beiden Exons vor und nach Exon 26A kodiert werden. Entgegen einer früheren Publikation, in der das Fehlen des Exons 22 berichtet wurde, konnten Peptide identifiziert werden, die belegen, dass dieses Exon im Falle des Hautelastins nicht vollständig ausgespleißt ist. Auch für die Exons 23, 32 und 33, für die teilweise ein Ausspleißen beschrieben wurde, konnten Peptide nachgewiesen werden. Weiterhin konnten Aminosäuren des Exons 23A gefunden werden, das in vielen Isoformen des Tropoelastins nicht vorhanden ist. Die identifizierten Bereiche der Primärstruktur ergaben eine hohe Übereinstimmung des untersuchten Elastins mit der Isoform 10 des Tropoelastins.

Erstmalig wurde die Prolinhydroxylierung in humanem Hautelastin anhand von 43 Peptiden nachgewiesen. Aus diesen Peptidsequenzen ließen sich 33 Positionen partieller Hydroxylierung ermitteln. Die Position eines weiteren Hydroxyprolins konnte nicht bestimmt werden. Der maximale, auf die Prolingesamtzahl der Isoform 10 des Tropoelastins bezogene Hydroxylierungsgrad beträgt 37,4 %. Es ist davon auszugehen, dass die Prolinhydroxylierung nicht ohne Einfluss auf die Tertiärstruktur des Tropoelastins bleibt und damit möglicherweise auch von Bedeutung für die Elastogenese ist.

Die vorgestellten Methoden bieten neuartige Möglichkeiten zur Untersuchung des Elastins. So kann beispielsweise Fragen bezüglich der Degradation des Elastins durch extrazellulär vorliegende Matrixmetalloproteinasen und einer potenziellen Verlangsamung durch Inhibitoren wie Elafin nachgegangen werden. Darüber hinaus lassen sich mithilfe von aus Gewebe isoliertem Elastin Veränderungen in seiner Primärstruktur und in den Quervernetzungen, die im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten sowie Alterungsprozessen stehen, auf biochemischer Ebene untersuchen. Dies kann zum Verständnis pathologischer Vorgänge entscheidend beitragen und die Suche nach Therapiemöglichkeiten erleichtern.

6 LITERATUR

- Abrams, W. R., Ma, R. I., Kucich, U., Bashir, M. M., Decker, S., Tsipouras, P., Mcpherson, J. D., Wasmuth, J. J. und Rosenbloom, J. (1995) Molecular-cloning of the microfibrillar protein Mfap3 and assignment of the gene to humanchromosome 5q32-Q33.2. *Genomics* 26 (1): 47-54.
- Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. und Itoh, T. (1998) Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *J Dairy Sci* 81 (12): 3131-3138.
- Alexandrov, M. L., Gall, L. N., Krasnov, N. V., Nikolaev, V. I., Pavlenko, V. A. und Shkurov, V. A. (1984) Ion extraction from solutions at atmospheric-pressure - a method of mass-spectrometric analysis of bioorganic substances [in Russisch]. Dok Akad Nauk SSSR 277 (2): 379-383.
- Baev, A. A., Smirnov, I. K. und Gorodetskii, S. I. (1987) Primary structure of cDNA for bovine beta-casein. *Mol Biol (Mosk)* 21 (1): 255-265.
- Bahr, U., Karas, M. und Hillenkamp, F. (1994) Analysis of biopolymers by matrixassisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry. *Fresenius' J Anal Chem* 348 (12): 783-791.
- Bashir, M. M., Indik, Z., Yeh, H., Ornstein-Goldstein, 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 (15): 8887-8891.
- Bentley, J. P. und Hanson, A. N. (1969) Hydroxyproline of elastin. *Biochim Biophys Acta* 175 (2): 339-344.
- Berg, R. A. und Prockop, D. J. (1973) Thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen - evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing triple-helix of collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 52 (1): 115-120.
- Berrocal, R., Chanton, S., Juillerat, M. A., Pavillard, B., Scherz, J. C. und Jost, R. (1989) Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium. *J Dairy Res* 56 (3): 335-341.
- Biemann, K. und Martin, S. A. (1987) Mass-spectrometric determination of the aminoacid-sequence of peptides and proteins. *Mass Spectrometry Reviews* 6 (1): 1-75.
- Biemann, K. (1992) Mass spectrometry of peptides and proteins. *Annu Rev Biochem* 61: 977-1010.
- Blencowe, B. J. (2006) Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* 126 (1): 37-47.
- Bodnar, W. M., Blackburn, R. K., Krise, J. M. und Moseley, M. A. (2003) Exploiting the complementary nature of LC/MALDI/MS/MS and LC/ESI/MS/MS for increased proteome coverage. *J Am Soc Mass Spectrom* 14 (9): 971-979.
- Bressan, G. M., Daga-Gordini, D., Colombatti, A., Castellani, I., Marigo, V. und Volpin, D. (1993) Emilin, a component of elastic fibers preferentially located at the elastin-microfibrils interface. *J Cell Biol* 121 (1): 201-212.
- 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** (30): 17778-17783.
- Bruins, A. P., Covey, T. R. und Henion, J. D. (1987) Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. in: Anal Chem, 59.
- Campos, L. A. und Sancho, J. (2003) The active site of pepsin is formed in the intermediate conformation dominant at mildly acidic pH. *FEBS Lett* 538 (1-3): 89-95.
- Chen, T., Kao, M. Y., Tepel, M., Rush, J. und Church, G. M. (2001) A dynamic programming approach to de novo peptide sequencing via tandem mass spectrometry. *J Comput Biol* 8 (3): 325-337.

- Cleary, E. G. und Gibson, M. A. (1996) Elastic tissue, elastin and elastin-associated microfibrils. in: *Extracellular Matrix, Vol2, Molecular Components and Interactions*. Comper, W. D. (Hrsg.), Harwood Academic Publishers, Amsterdam: 95-140.
- Collins, J. F. und Fine, R. (1981) The enzymatic digestion of elastin at acidic pH. *Biochim Biophys Acta* 657 (1): 295-303.
- Cordero, M. M., Cornish, T. J., Cotter, R. J. und Lys, I. A. (1995) Sequencing peptides without scanning the reflectron: post-source decay with a curved-field reflectron time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* 9 (14): 1356-1361.
- Cornish, T. J. und Cotter, R. J. (1994) A curved field reflectron time-of-flight mass spectrometer for the simultaneous focusing of metastable product ions. *Rapid Commun Mass Spectrom* 8 (9): 781-785.
- Dahlbäck, K., Ljungquist, A., Löfberg, H., Dahlbäck, B., Engvall, E. und Sakai, L. Y. (1990) Fibrillin immunoreactive fibers constitute a unique network in the human dermis: immunohistochemical comparison of the distributions of fibrillin, vitronectin, amyloid P component, and orcein stainable structures in normal skin and elastosis. J Invest Dermatol 94 (3): 284-291.
- Dancik, V., Addona, T. A., Clauser, K. R., Vath, J. E. und Pevzner, P. A. (1999) De novo peptide sequencing via tandem mass spectrometry. *J Comput Biol* 6 (3-4): 327-342.
- **Daniel, H.** (2004) Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu Rev Physiol* **66**: 361-384.
- **Davidson, J. M.** (2002) Smad about elastin regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26** (2): 164-166.
- Davies, D. T. und Law, A. J. R. (1980) Content and composition of protein in creamery milks in Southwest Scotland. *J Dairy Res* 47 (1): 83-90.
- **Debelle, L. und Tamburro, A. M.** (1999) Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol* **31** (2): 261-272.
- **Demine, R. und Walden, P.** (2004) Sequit: software for de novo peptide sequencing by matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **18** (8): 907-913.
- Dietz, H. C., Ramirez, F. und Sakai, L. Y. (1994) Marfan's syndrome and other microfibrillar diseases. *Adv Hum Genet* 22: 153-186.
- Dole, M., Hines, R. L., Mack, L. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D. und Alice, M. B. (1968a) Gas phase macroions. *Macromolecules* 1 (1): 96-97.
- Dole, M., Mack, L. L., Hines, R. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D. und Alice, M. B. (1968b) Molecular beams of macroions. *J Chem Phys* **49** (5): 2240-2249.
- Dong, C. und Ng-Kwai-Hang, K. F. (1999) Characterization of a non-electrophoretic genetic variant of beta-case by peptide mapping and mass spectrometric analysis. *Int Dairy J* 8 (12): 967-972.
- Dunn, D. M. und Franzblau, C. (1982) Effects of ascorbate on insoluble elastin accumulation and cross-link formation in rabbit pulmonary artery smooth muscle cultures. *Biochemistry* 21 (18): 4195-4202.
- Edman, P. und Begg, G. (1967) A Protein Sequenator. Eur J Biochem 1 (1): 80-91.
- Emmett, M. R. und Caprioli, R. M. (1994) Micro-electrospray mass-spectrometry ultra-high-sensitivity analysis of peptides and proteins. J Am Soc Mass Spectrom 5 (7): 605-613.
- Eng, J. K., McCormack, A. L. und Yates, J. R., III (1994) An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom* 5 (11): 976-989.
- Ewart, A. K., Morris, C. A., Atkinson, D., Jin, W., Sternes, K., Spallone, P., Stock, A. D., Leppert, M. und Keating, M. T. (1993a) Hemizygosity at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nat Genet* 5 (1): 11-16.
- Ewart, A. K., Morris, C. A., Ensing, G. J., Loker, J., Moore, C., Leppert, M. und Keating, M. (1993b) A human vascular disorder, supravalvular aortic stenosis, maps to chromosome 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (8): 3226-3230.

- Fazio, M. J., Olsen, D. R., Kauh, E. A., Baldwin, C. T., Indik, Z., Ornstein-Goldstein, N., Yeh, H., Rosenbloom, J. und Uitto, J. (1988a) Cloning of full-length elastin cDNAs from a human skin fibroblast recombinant cDNA library: further elucidation of alternative splicing utilizing exon-specific oligonucleotides. J Invest Dermatol 91 (5): 458-464.
- Fazio, M. J., Olsen, D. R., Kuivaniemi, H., Chu, M. L., Davidson, J. M., Rosenbloom, J. und Uitto, J. (1988b) Isolation and characterization of human elastin cDNAs, and age-associated variation in elastin gene expression in cultured skin fibroblasts. *Lab Invest* 58 (3): 270-277.
- Fazio, M. J., Mattei, M. G., Passage, E., Chu, M. L., Black, D., Solomon, E., Davidson, J. M. und Uitto, J. (1991) Human elastin gene: new evidence for localization to the long arm of chromosome 7. Am J Hum Genet 48 (4): 696-703.
- Fenyö, D. (2000) Identifying the proteome: software tools. *Curr Opin Biotechnol* 11 (4): 391-395.
- Fiat, A. M., Miglioresamour, D., Jolles, P., Drouet, L., Sollier, C. B. D. und Caen, J. (1993) Biologically-active peptides from milk-proteins with emphasis on 2 examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *J Dairy Sci* 76 (1): 301-310.
- FitzGerald, R. J., Murray, B. A. und Walsh, D. J. (2004) Hypotensive peptides from milk proteins. *J Nutr* 134 (4): 980S-988S.
- Folk, J. E. und Cole, P. W. (1965) Chymotrypsin C. II. Enzymatic specificity toward several polypeptides. *J Biol Chem* 240: 193-197.
- Foster, J. A., Rubin, L., Kagan, H. M., Franzbla.C, Bruenger, E. und Sandberg, L. B. (1974) Isolation and Characterization of Crosslinked Peptides from Elastin. J Biol Chem 249 (19): 6191-6196.
- Fox, P. F. (1989) The milk protein system. in: Developments in Dairy Chemistry 4 Functional Milk Proteins. Fox, P. F. (Hrsg.), Elsevier Applied Sciences, New York, NY: 1-53.
- Fujioka, H. und Scheraga, H. A. (1965) Structural studies of ribonuclease. XVIII. An investigation of the peptic digestion products of ribonuclease. *Biochemistry (Mosc)* 4 (10): 2197-2205.
- Fung, Y. C. (1993) Biomechanics: Mechanical properties of living tissues. Springer-Verlag, New York.
- Gerhard, D. S., Wagner, L., Feingold, E. A., Shenmen, C. M., Grouse, L. H., Schuler, G., Klein, S. L., Old, S., Rasooly, R., Good, P., Guyer, M., Peck, A. M., Derge, J. G., Lipman, D., Collins, F. S., Jang, W., Sherry, S., Feolo, M., Misquitta, L., Lee, E., Rotmistrovsky, K., Greenhut, S. F., Schaefer, C. F., Buetow, K., Bonner, T. I., Haussler, D., Kent, J., Kiekhaus, M., Furey, T., Brent, M., Prange, C., Schreiber, K., Shapiro, N., Bhat, N. K., Hopkins, R. F., Hsie, F., Driscoll, T., Soares, M. B., Casavant, T. L., Scheetz, T. E., Brown-stein, M. J., Usdin, T. B., Toshiyuki, S., Carninci, P., Piao, Y., Dudekula, D. B., Ko, M. S., Kawakami, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Gruber, C. E., Smith, M. R., Simmons, B., Moore, T., Waterman, R., Johnson, S. L., Ruan, Y., Wei, C. L., Mathavan, S., Gunaratne, P. H., Wu, J., Garcia, A. M., Hulyk, S. W., Fuh, E., Yuan, Y., Sneed, A., Kowis, C., Hodgson, A., Muzny, D. M., McPherson, J., Gibbs, R. A., Fahey, J., Helton, E., Ketteman, M., Madan, A., Rodrigues, S., Sanchez, A., Whiting, M., Madari, A., Young, A. C., Wetherby, K. D., Granite, S. J., Kwong, P. N., Brinkley, C. P., Pearson, R. L., Bouffard, G. G., Blakesly, R. W., Green, E. D., Dickson, M. C., Rodriguez, A. C., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R. M., Butterfield, Y. S., Griffith, M., Griffith, O. L., Krzywinski, M. I., Liao, N., Morin, R., Palmquist, D., Petrescu, A. S., Skalska, U., Smailus, D. E., Stott, J. M., Schnerch, A., Schein, J. E., Jones, S. J., Holt, R. A., Baross, A., Marra, M. A., Clifton, S., Makowski, K. A., Bosak, S. und Malek, J. (2004) The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC). Genome Res 14 (10B): 2121-2127.
- Gibson, M. A., Sandberg, L. B., Grosso, L. E. und Cleary, E. G. (1991) Complementary DNA cloning establishes microfibril-associated glycoprotein (MAGP) to be a

discrete component of the elastin-associated microfibrils. *J Biol Chem* **266** (12): 7596-7601.

- Gibson, M. A., Hatzinikolas, G., Kumaratilake, J. S., Sandberg, L. B., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R. und Cleary, E. G. (1996) Further characterization of proteins associated with elastic fiber microfibrils including the molecular cloning of MAGP-2 (MP25). *J Biol Chem* 271 (2): 1096-1103.
- Gilchrest, B. A. (1989) Skin aging and photoaging: an overview. J Am Acad Dermatol 21 (3 Pt 2): 610-613.
- Glückmann, M., Pfenninger, A., Krüger, R., Thierolf, M., Karas, M., Horneffer, V., Hillenkamp, F. und Strupat, K. (2001) Mechanisms in MALDI analysis: surface interaction or incorporation of analytes? *Int J Mass Spectrom* 210 (1-3): 121-132.
- Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F. und Addeo, F. (2000) Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus SS1 and Lactococcus lactis subsp cremoris FT4. *Appl Environ Microbiol* **66** (9): 3898-3904.
- Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A. und Di Cagno, R. (2002) Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Crit Rev Food Sci Nutr* **42** (3): 223-239.
- Greenlee, T. K., Jr., Ross, R. und Hartman, J. L. (1966) The fine structure of elastic fibers. J Cell Biol 30 (1): 59-71.
- Grosclaude, F., Mahe, M. F., Mercier, J. C. und Ribadeau-Dumas, B. (1972) Characterization of genetic variants of a S1 and bovine caseins. *Eur J Biochem* 26 (3): 328-337.
- Grosclaude, F., Mahe, M. F. und Voglino, G. F. (1974) The beta E variant and the phosphorylation code of bovine caseins. *FEBS Lett* **45** (1): 3-5.
- Gross, J. H. (2004) Mass Spectrometry. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Grosso, L. E. und Mecham, R. P. (1988) In vitro processing of tropoelastin: investigation of a possible transport function associated with the carboxy-terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun* 153 (2): 545-551.
- Han, S. K., Shin, Y. C. und Byun, H. D. (2000) Biochemical, molecular and physiological characterization of a new beta-casein variant detected in Korean cattle. *Anim Genet* 31 (1): 49-51.
- 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 (5): 359-366.
- Henzel, W. J., Stults, J. T. und Watanabe, C. (1989). Proceedings of the Third Symposium of the Protein Society, Seattle, WA.
- Henzel, W. J., Billeci, T. M., Stults, J. T., Wong, S. C., Grimley, C. und Watanabe, C. (1993) Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (11): 5011-5015.
- Hillier, L. W., Fulton, R. S., Fulton, L. A., Graves, T. A., Pepin, K. H., Wagner-McPherson, C., Layman, D., Maas, J., Jaeger, S., Walker, R., Wylie, K., Sekhon, M., Becker, M. C., O'Laughlin, M. D., Schaller, M. E., Fewell, G. A., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Nash, W. E., Cordes, M., Du, H., Sun, H., Edwards, J., Bradshaw-Cordum, H., Ali, J., Andrews, S., Isak, A., Vanbrunt, A., Nguyen, C., Du, F., Lamar, B., Courtney, L., Kalicki, J., Ozersky, P., Bielicki, L., Scott, K., Holmes, A., Harkins, R., Harris, A., Strong, C. M., Hou, S., Tomlinson, C., Dauphin-Kohlberg, S., Kozlowicz-Reilly, A., Leonard, S., Rohlfing, T., Rock, S. M., Tin-Wollam, A. M., Abbott, A., Minx, P., Maupin, R., Strowmatt, C., Latreille, P., Miller, N., Johnson, D., Murray, J., Woessner, J. P., Wendl, M. C., Yang, S. P., Schultz, B. R., Wallis, J. W., Spieth, J., Bieri, T. A., Nelson, J. O., Berkowicz, N., Wohldmann, P. E., Cook, L. L., Hickenbotham, M. T., Eldred, J., Williams, D., Bedell, J. A., Mardis, E. R., Clifton, S. W., Chissoe, S. L., Marra, M. A., Raymond, C., Haugen, E., Gillett, W., Zhou, Y., James, R., Phelps, K., Iadanoto, S., Bubb, K., Simms, E., Levy, R., Clendenning, J., Kaul, R., Kent, W. J., Furey, T. S., Baertsch, R. A., Brent, M. R.,

Keibler, E., Flicek, P., Bork, P., Suyama, M., Bailey, J. A., Portnoy, M. E., Torrents, D., Chinwalla, A. T., Gish, W. R., Eddy, S. R., McPherson, J. D., Olson, M. V., Eichler, E. E., Green, E. D., Waterston, R. H. und Wilson, R. K. (2003) The DNA sequence of human chromosome 7. *Nature* **424** (6945): 157-164.

- Hinek, A. und Rabinovitch, M. (1994) 67-kD elastin-binding protein is a protective "companion" of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin. J Cell Biol 126 (2): 563-574.
- Hinek, A. (1995) The 67 kDa spliced variant of beta-galactosidase serves as a reusable protective chaperone for tropoelastin. *Ciba Found Symp* **192**: 185-196.
- Hoff, C. R., Perkins, D. R. und Davidson, J. M. (1999) Elastin gene expression is upregulated during pulmonary fibrosis. *Connect Tissue Res* 40 (2): 145-153.
- Holzenberger, M., Levi-Minzi, S. A., Herzog, C. P., Deak, S. B., Robert, L. und Boyd, C. D. (1993) Quantitation of tropoelastin mRNA and assessment of alternative splicing in human skin fibroblasts by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *PCR Methods Appl* 3 (2): 107-114.
- Höök, F., Kasemo, B., Nylander, T., Fant, C., Sott, K. und Elwing, H. (2001) Variations in coupled water, viscoelastic properties, and film thickness of a Mefp-1 protein film during adsorption and cross-linking: a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, ellipsometry, and surface plasmon resonance study. *Anal Chem* 73 (24): 5796-5804.
- Hopp, T. P. und Woods, K. R. (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (6): 3824-3828.
- Horn, D. M., Zubarev, R. A. und McLafferty, F. W. (2000) Automated de novo sequencing of proteins by tandem high-resolution mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (19): 10313-10317.
- Horrigan, S. K., Rich, C. B., Streeten, B. W., Li, Z. Y. und Foster, J. A. (1992) Characterization of an associated microfibril protein through recombinant-DNA techniques. *J Biol Chem* 267 (14): 10087-10095.
- **IHGSC** (2004) International Human Genome Sequencing Consortium: Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431** (7011): 931-945.
- 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 (16): 5680-5684.
- Indik, Z., Yeh, H., Ornstein-Goldstein, N., Kucich, U., Abrams, W., Rosenbloom, J. C. und Rosenbloom, J. (1989) Structure of the elastin gene and alternative splicing of elastin mRNA: implications for human disease. *Am J Med Genet* 34 (1): 81-90.
- Isogai, Z., Aspberg, A., Keene, D. R., Ono, R. N., Reinhardt, D. P. und Sakai, L. Y. (2002) Versican interacts with fibrillin-1 and links extracellular microfibrils to other connective tissue networks. *J Biol Chem* 277 (6): 4565-4572.
- James, P., Quadroni, M., Carafoli, E. und Gonnet, G. (1993) Protein identification by mass profile fingerprinting. *Biochem Biophys Res Commun* 195 (1): 58-64.
- Jann, O., Ceriotti, G., Caroli, A. und Erhardt, G. (2002) A new variant in exon VII of bovine beta-casein gene (CSN2) and its distribution among European cattle breeds. J Anim Breed Genet 119 (1): 65-68.
- Jenkins, C. L., Bretscher, L. E., Guzei, I. A. und Raines, R. T. (2003) Effect of 3hydroxyproline residues on collagen stability. J Am Chem Soc 125 (21): 6422-6427.
- Jimenez-Flores, R., Kang, Y. C. und Richardson, T. (1987) Cloning and sequence analysis of bovine beta-casein cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 142 (2): 617-621.
- Juraschek, R., Dülcks, T. und Karas, M. (1999) Nanoelectrospray--more than just a minimized-flow electrospray ionization source. *J Am Soc Mass Spectrom* **10** (4): 300-308.
- 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** (1): 25-29.

- Kagan, H. M. und Sullivan, K. A. (1982) Lysyl oxidase: preparation and role in elastin biosynthesis. *Methods Enzymol* 82 Pt A: 637-650.
- Kagan, H. M., Vaccaro, C. A., Bronson, R. E., Tang, S. S. und Brody, J. S. (1986) Ultrastructural immunolocalization of lysyl oxidase in vascular connective tissue. J Cell Biol 103 (3): 1121-1128.
- Kagan, H. M. und Cai, P. (1995) Isolation of active site peptides of lysyl oxidase. *Methods Enzymol* 258: 122-132.
- Karas, M. und Hillenkamp, F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 60 (20): 2299-2301.
- Karas, M., Bahr, U. und Dülcks, T. (2000) Nano-electrospray ionization mass spectrometry: addressing analytical problems beyond routine. *Fresenius' J Anal Chem* 366 (6-7): 669-676.
- Karas, M. und Krüger, R. (2003) Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism. *Chem Rev* 103 (2): 427-440.
- Kawakami, K., Yasuda, M., Ishii, K., Kokusenya, Y. und Sato, T. (1999) A kinetic study of protein binding to ecabet sodium using quartz-crystal microbalance. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 47 (7): 919-922.
- Kleine, R. (1982) Properties of thermitase, a thermostable serine protease from Thermoactinomyces vulgaris. *Acta Biol Med Ger* **41** (1): 89-102.
- Kligman, L. H. und Kligman, A. M. (1986) The nature of photoaging: its prevention and repair. *Photodermatol* **3** (4): 215-227.
- Knochenmuss, R. und Zenobi, R. (2003) MALDI ionization: the role of in-plume processes. *Chem Rev* 103 (2): 441-452.
- Kobayashi, R., Tashima, Y., Masuda, H., Shozawa, T., Numata, Y., Miyauchi, K. und Hayakawa, T. (1989) Isolation and characterization of a new 36-kDa microfibrilassociated glycoprotein from porcine aorta. *J Biol Chem* **264** (29): 17437-17444.
- Koch, G., Wiedemann, K. und Teschemacher, H. (1985) Opioid activities of human beta-casomorphins. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **331** (4): 351-354.
- Konigsberg, W., Goldstein, J. und Hill, R. J. (1963) The structure of human hemoglobin. VII. The digestion of the beta chain of human hemoglobin with pepsin. *J Biol Chem* 238: 2028-2033.
- Korhonen, H. und Pihlanto, A. (2006) Bioactive peptides: Production and functionality. *Int Dairy J* 16 (9): 945-960.
- Kuulasmaa, K., Tunstall-Pedoe, H., Dobson, A., Fortmann, S., Sans, S., Tolonen, H., Evans, A., Ferrario, M. und Tuomilehto, J. (2000) Estimation of contribution of changes in classic risk factors to trends in coronary-event rates across the WHO MONICA Project populations. *Lancet* 355 (9205): 675-687.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissoe, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R. A., Muzny, D. M., Scherer, S. E., Bouck, J. B., Sodergren, E. J., Worley, K. C., Rives, C. M., Gorrell, J. H., Metzker, M. L., Navlor, S. L., Kucherlapati, R. S., Nelson, D. L., Weinstock, G. M., Sakaki, Y.,

Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D. R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H. M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Ču, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R. W., Federspiel, N. A., Abola, A. P., Proctor, M. J., Myers, R. M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D. R., Olson, M. V., Kaul, R., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G. A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B. A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W. R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J. A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D. G., Burge, C. B., Cerutti, L., Chen, H. C., Church, D., Clamp, M., Copley, R. R., Doerks, T., Eddy, S. R., Éichler, E. E., Furey, T. S., Galagan, J., Gilbert, J. G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L. S., Jones, T. A., Kasif, S., Kaspryzk, A., Kennedy, S., Kent, W. J., Kitts, P., Koonin, E. V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T. M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J. V., Mulder, N., Pollara, V. J., Ponting, C. P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A. F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y. I., Wolfe, K. H., Yang, S. P., Yeh, R. F., Collins, F., Guyer, M. S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K. A., Patrinos, A., Morgan, M. J., de Jong, P., Catanese, J. J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S. und Chen, Y. J. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409 (6822): 860-921.

- Laugesen, M. und Elliott, R. (2003) Ischaemic heart disease, type 1 diabetes, and cow milk A1 beta-casein. NZ Med J 116 (1168): 295-313.
- Leadbeater, L. und Ward, F. B. (1987) Analysis of tryptic digests of bovine beta-casein by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **397**: 435-443.
- Lehmann, W. D. (1996) Massenspektrometrie in der Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Leibach, F. H. und Ganapathy, V. (1996) Peptide transporters in the intestine and the kidney. Annu Rev Nutr 16: 99-119.
- Lemieux, L. und Amiot, J. (1989) Application of reversed-phase high-performance liquid chromatography to the separation of peptides from phosphorylated and dephosphorylated casein hydrolysates. *J Chromatogr A* **473**: 189-206.
- Li, D. Y., Toland, A. E., Boak, B. B., Atkinson, D. L., Ensing, G. J., Morris, C. A. und Keating, M. T. (1997) Elastin point mutations cause an obstructive vascular disease, supravalvular aortic stenosis. *Hum Mol Genet* 6 (7): 1021-1028.
- Li, D. Y., Brooke, B., Davis, E. C., Mecham, R. P., Sorensen, L. K., Boak, B. B., Eichwald, E. und Keating, M. T. (1998) Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature* 393 (6682): 276-280.
- Liptay, M. J., Botney, M. D., Mecham, R. P., Rosenbloom, J., Cooper, J. D. und Kaiser, L. R. (1991) The detection of a unique isoform of elastin in human hypertensive pulmonary arteries. Surg Forum 42: 287-289.
- Liu, X. Q., Zhao, Y., Gao, J. G., Pawlyk, B., Starcher, B., Spencer, J. A., Yanagisawa, H., Zuo, J. und Li, T. S. (2004) Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidaselike 1 protein. *Nat Genet* 36 (2): 178-182.
- Liu, Y. C., Wang, C. M. und Hsiung, K. P. (2001) Comparison of different protein immobilization methods on quartz crystal microbalance surface in flow injection immunoassay. *Anal Biochem* 299 (2): 130-135.
- Livney, Y. D., Schwan, A. L. und Dalgleish, D. G. (2004) A study of beta-casein tertiary structure by intramolecular crosslinking and mass spectrometry. *J Dairy Sci* 87 (11): 3638-3647.
- Loken, M. K., Terrill, K. D., Marvin, J. F. und Mosser, D. G. (1958) Comparative studies of three methods for measuring pepsin activity. *J Gen Physiol* 42 (2): 251-258.

- Lottspeich, F. und Zorbas, H., Hrsg. (1998) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Lottspeich, F. und Engels, J. W., Hrsg. (2006) *Bioanalytik*, 2. Auflage. Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag, München, Heidelberg.
- Ma, B., Zhang, K., Hendrie, C., Liang, C., Li, M., Doherty-Kirby, A. und Lajoie, G. (2003) PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17 (20): 2337-2342.
- Mack, L. L., Kralik, P., Rheude, A. und Dole, M. (1970) Molecular beams of macroions. II. J Chem Phys 52 (10): 4977-4986.
- Maeno, M., Yamamoto, N. und Takano, T. (1996) Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from Lactobacillus helveticus CP790. J Dairy Sci 79 (8): 1316-1321.
- Mandl, I., Darnule, T. V., Fierer, J. A., Keller, S. und Turino, G. M. (1977) Elastin degradation in human and experimental emphysema. *Adv Exp Med Biol* 79: 221-231.
- Mann, M., Hojrup, P. und Roepstorff, P. (1993) Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biol Mass Spectrom* 22 (6): 338-345.
- Mann, M. und Wilm, M. (1994) Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. *Anal Chem* 66 (24): 4390-4399.
- Marchesseau, S., Mani, J. C., Martineau, P., Roquet, F., Cuq, J. L. und Pugniere, M. (2002) Casein interactions studied by the surface plasmon resonance technique. *J Dairy Sci* 85 (11): 2711-2721.
- Martin, S. L., Vrhovski, B. und Weiss, A. S. (1995) Total synthesis and expression in Escherichia coli of a gene encoding human tropoelastin. *Gene* **154** (2): 159-166.
- Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N. und Suzuki, H. (1985) Angiotensin-Iconverting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. in: *Agric Biol Chem*, **49**.
- Matsui, T., Tamaya, K., Seki, E., Osajima, K., Matsumoto, K. und Kawasaki, T. (2002) Val-Tyr as a natural antihypertensive dipeptide can be absorbed into the human circulatory blood system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **29** (3): 204-208.
- McLachlan, C. N. (2001) beta-Casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Med Hypotheses* 56 (2): 262-272.
- Mecham, R. P., Hinek, A., Entwistle, R., Wrenn, D. S., Griffin, G. L. und Senior, R.
 M. (1989) Elastin binds to a multifunctional 67-kilodalton peripheral membrane protein. *Biochemistry* 28 (9): 3716-3722.
- Meisel, H., Frister, H. und Schlimme, E. (1989) Biologically active peptides in milk proteins. Z Ernährungswiss 28 (4): 267-278.
- Meisel, H. und Schlimme, E. (1990) Milk proteins: precursors of bioactive peptides. *Trends Food Sci Technol* 1 (2): 41-43.
- Meisel, H. und Schlimme, E. (1994) Inhibitors of angiotensin converting enzyme derived from bovine casein (casokinins). in: *Beta-Casomorphins and Related Peptides: Recent Developments*. Brantl, V. und Teschemacher, H. (Hrsg.), Weinheim: VCH.: 27-33.
- Meisel, H. und Bockelmann, W. (1999) Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie Leeuwenhoek* 76 (1-4): 207-215.
- Mithieux, S. M. und Weiss, A. S. (2005) Elastin. Adv Protein Chem 70: 437-461.
- Mizuno, K., Hayashi, T., Peyton, D. H. und Bachinger, H. P. (2004) The peptides acetyl-(Gly-3(S)Hyp-4(R)Hyp)10-NH2 and acetyl-(Gly-Pro-3(S)Hyp)10-NH2 do not form a collagen triple helix. *J Biol Chem* 279 (1): 282-287.
- Mongiat, M., Mungiguerra, G., Bot, S., Mucignat, M. T., Giacomello, E., Doliana, R. und Colombatti, A. (2000) Self-assembly and supramolecular organization of EMILIN. J Biol Chem 275 (33): 25471-25480.
- Nakamura, T., Lozano, P. R., Ikeda, Y., Iwanaga, Y., Hinek, A., Minamisawa, S., Cheng, C. F., Kobuke, K., Dalton, N., Takada, Y., Tashiro, K., Ross Jr, J.,

Honjo, T. und Chien, K. R. (2002) Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. *Nature* **415** (6868): 171-175.

- Noblesse, E., Cenizo, V., Bouez, C., Borel, A., Gleyzal, C., Peyrol, S., Jacob, M. P., Sommer, P. und Damour, O. (2004) Lysyl oxidase-like and lysyl oxidase are present in the dermis and epidermis of a skin equivalent and in human skin and are associated to elastic fibers. *J Investig Dermatol* **122** (3): 621-630.
- **Oka, T. und Morihara, K.** (1970) Specificity of pepsin: Size and property of the active site. *FEBS Lett* **10** (4): 222-224.
- Olsen, J. V., Ong, S. E. und Mann, M. (2004) Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol Cell Proteomics* **3** (6): 608-614.
- Ota, T., Suzuki, Y., Nishikawa, T., Otsuki, T., Sugiyama, T., Irie, R., Wakamatsu, A., Hayashi, K., Sato, H., Nagai, K., Kimura, K., Makita, H., Sekine, M., Obayashi, M., Nishi, T., Shibahara, T., Tanaka, T., Ishii, S., Yamamoto, J., Saito, K., Kawai, Y., Isono, Y., Nakamura, Y., Nagahari, K., Murakami, K., Yasuda, T., Iwayanagi, T., Wagatsuma, M., Shiratori, A., Sudo, H., Hosoiri, T., Kaku, Y., Kodaira, H., Kondo, H., Sugawara, M., Takahashi, M., Kanda, K., Yokoi, T., Furuya, T., Kikkawa, E., Omura, Y., Abe, K., Kamihara, K., Katsuta, N., Sato, K., Tanikawa, M., Yamazaki, M., Ninomiya, K., Ishibashi, T., Yamashita, H., Murakawa, K., Fujimori, K., Tanai, H., Kimata, M., Watanabe, M., Hiraoka, S., Chiba, Y., Ishida, S., Ono, Y., Takiguchi, S., Watanabe, S., Yosida, M., Ho-tuta, T., Kusano, J., Kanehori, K., Takahashi-Fujii, A., Hara, H., Tanase, T., Nomura, Y., Togiya, S., Komai, F., Hara, R., Takeuchi, K., Arita, M., Imose, N., Musashino, K., Yuuki, H., Oshima, A., Sasaki, N., Aotsuka, S., Yoshikawa, Y., Matsunawa, H., Ichihara, T., Shiohata, N., Sano, S., Moriya, S., Momiyama, H., Satoh, N., Takami, S., Terashima, Y., Suzuki, O., Nakagawa, S., Senoh, A., Mizoguchi, H., Goto, Y., Shimizu, F., Wakebe, H., Hishigaki, H., Watanabe, T., Sugiyama, A., Takemoto, M., Kawakami, B., Yamazaki, M., Watanabe, K., Kumagai, A., Itakura, S., Fukuzumi, Y., Fujimori, Y., Komiyama, M., Tashiro, H., Tanigami, A., Fujiwara, T., Ono, T., Yamada, K., Fujii, Y., Ozaki, K., Hirao, M., Ohmori, Y., Kawabata, A., Hikiji, T., Kobatake, N., Inagaki, H., Ikema, Y., Okamoto, S., Okitani, R., Kawakami, T., Noguchi, S., Itoh, T., Shigeta, K., Senba, T., Matsumura, K., Nakajima, Y., Mizuno, T., Morinaga, M., Sasaki, M., Togashi, T., Oyama, M., Hata, H., Watanabe, M., Komatsu, T., Mizushima-Sugano, J., Satoh, T., Shirai, Y., Takahashi, Y., Nakagawa, K., Okumura, K., Nagase, T., Nomura, N., Kikuchi, H., Masuho, Y., Yamashita, R., Nakai, K., Yada, T., Nakamura, Y., Ohara, O., Isogai, T. und Sugano, S. (2004) Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. Nat Genet 36 (1): 40-45.
- Pappin, D. J. C., Hojrup, P. und Bleasby, A. J. (1993) Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* 3 (6): 327-332.
- Parks, W. C. und Deak, S. B. (1990) Tropoelastin heterogeneity: implications for protein function and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2 (5): 399-406.
- Partridge, S. M., Davis, H. F. und Adair, G. S. (1955) The chemistry of connective tissues. 2. Soluble proteins derived from partial hydrolysis of elastin. *Biochem J* 61 (1): 11-21.
- Partridge, S. M., Elsden, D. F., Thomas, J., Dorfman, A., Telser, A. und Ho, P. L. (1964) Biosynthesis of the desmosine and isodesmosine cross-bridges in elastin. *Biochem J* 93 (3): 30C-33C.
- Pasquali-Ronchetti, I. und Baccarani-Contri, M. (1997) Elastic fiber during development and aging. *Microsc Res Tech* 38 (4): 428-435.
- Peng, J. und Gygi, S. P. (2001) Proteomics: the move to mixtures. *J Mass Spectrom* 36 (10): 1083-1091.
- Perejda, A. J., Abraham, P. A., Carnes, W. H., Coulson, W. F. und Uitto, J. (1985) Marfan's syndrome: structural, biochemical, and mechanical studies of the aortic media. J Lab Clin Med 106 (4): 376-383.

- Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. und Cottrell, J. S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20 (18): 3551-3567.
- Petersen, E., Wagberg, F. und Angquist, K. A. (2002) Serum concentrations of elastinderived peptides in patients with specific manifestations of atherosclerotic disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 24 (5): 440-444.
- Pierce, R. A., Deak, S. B., Stolle, C. A. und Boyd, C. D. (1990) Heterogeneity of rat tropoelastin mRNA revealed by cDNA cloning. *Biochemistry* 29 (41): 9677-9683.
- Pihlanto-Leppälä, A., Pirkko, A., Paakkari, I. und Korhonen, H. (2002) Biologically active peptides derived from milk proteins. in: Web-Compilations on Food System Functionality: Volume 1. Hague, Z. Z. (Hrsg.), http://www.msstate.edu/org/fsfa/Vol1/2-Pihlanto.htm.
- Piontkivska, H., Zhang, Y., Green, E. D. und Elnitski, L. (2004) Multi-species sequence comparison reveals dynamic evolution of the elastin gene that has involved purifying selection and lineage-specific insertions/deletions. *BMC Genomics* **5** (1): 31.
- Privitera, S., Prody, C. A., Callahan, J. W. und Hinek, A. (1998) The 67-kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of beta-galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein. *J Biol Chem* 273 (11): 6319-6326.
- Reese, M. G., Hartzell, G., Harris, N. L., Ohler, U., Abril, J. F. und Lewis, S. E. (2000) Genome annotation assessment in Drosophila melanogaster. *Genome Res* 10 (4): 483-501.
- Reiber, D. C., Brown, R. S., Weinberger, S., Kenny, J. und Bailey, J. (1998) Unknown peptide sequencing using matrix-assisted laser desorption/ionization and in-source decay. *Anal Chem* 70 (6): 1214-1222.
- Reinhardt, D. P., Sasaki, T., Dzamba, B. J., Keene, D. R., Chu, M. L., Gohring, W., Timpl, R. und Sakai, L. Y. (1996) Fibrillin-1 and fibulin-2 interact and are colocalized in some tissues. *J Biol Chem* 271 (32): 19489-19496.
- **Ribadeau-Dumas, B., Brignon, G., Grosclaude, F. und Mercier, J. C.** (1972) Primary structure of bovine beta-casein. Complete sequence. *Eur J Biochem* **25** (3): 505-514.
- Rival, S. G., Fornaroli, S., Boeriu, C. G. und Wichers, H. J. (2001) Caseins and casein hydrolysates. 1. Lipoxygenase inhibitory properties. *J Agric Food Chem* 49 (1): 287-294.
- Roark, E. F., Keene, D. R., Haudenschild, C. C., Godyna, S., Little, C. D. und Argraves, W. S. (1995) The association of human fibulin-1 with elastic fibers: an immunohistological, ultrastructural, and RNA study. *J Histochem Cytochem* 43 (4): 401-411.
- Robert, L., Robert, B. und Robert, A. M. (1970) Molecular biology of elastin as related to aging and atherosclerosis. *Exp Gerontol* **5** (4): 339-356.
- Robert, L., Robert, A. M. und Jacotot, B. (1998) Elastin-elastase-atherosclerosis revisited. *Atherosclerosis* 140 (2): 281-295.
- Roepstorff, P. und Fohlman, J. (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* 11 (11): 601.
- Rosenbloom, J. und Cywinski, A. (1976) Inhibition of proline hydroxylation does not inhibit secretion of tropoelastin by chick aorta cells. *FEBS Lett* 65 (2): 246-250.
- Rosenbloom, J., Bashir, M., Yeh, H., Ornstein-Goldstein, N., Fazio, M., Kahari, V. M. und Uitto, J. (1991) Regulation of elastin gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 624: 116-136.
- Rosenbloom, J. (1993) Elastin. in: Connective tissue and its heritable disorders : molecular, genetic, and medical aspects. Royes, P. M. und Steinmann, B. (Hrsg.), Wiley-Liss: 167-188.
- Ross, R. und Bornstein, P. (1969) The elastic fiber. I. The separation and partial characterization of its macromolecular components. *J Cell Biol* 40 (2): 366-381.
- Ross, R. (1973) The elastic fiber. J Histochem Cytochem 21 (3): 199-208.
- Ryle, A. P. (1970) Porcine pepsins and pepsinogens. Methods Enzymol 19: 316-336.
- Sakai, L. Y., Keene, D. R. und Engvall, E. (1986) Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol* **103** (6 Pt 1): 2499-2509.

- Salomoni, M., Muda, M., Zuccato, E. und Mussini, E. (1991) High-performance liquid chromatographic determination of desmosine and isodesmosine after phenylisothiocyanate derivatization. *J Chromatogr* 572 (1-2): 312-316.
- Sandberg, L. B., Weissman, N. und Smith, D. W. (1969) The purification and partial characterization of a soluble elastin-like protein from copper-deficient porcine aorta. *Biochemistry* 8 (7): 2940-2945.
- Schalinatus, E., Ruttloff, H. und Behnke, U. (1979) Studies on the Substrate-Specificity of a Protease from Thermoactinomyces-Vulgaris. *Nahrung* 23 (3): 275-281.
- Schmidt, A., Karas, M. und Dülcks, T. (2003) Effect of different solution flow rates on analyte ion signals in nano-ESI MS, or: when does ESI turn into nano-ESI? J Am Soc Mass Spectrom 14 (5): 492-500.
- Séverin, S. und Wenshui, X. (2005) Milk biologically active components as nutraceuticals: review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **45** (7-8): 645-656.
- Shah, N. P. (2000) Effects of milk-derived bioactives: an overview. Br J Nutr 84 Suppl 1: S3-S10.
- Shevchenko, A., Chernushevich, I., Wilm, M. und Mann, M. (2000) De Novo peptide sequencing by nanoelectrospray tandem mass spectrometry using triple quadrupole and quadrupole/time-of-flight instruments. in: *Methods Mol Biol*. Chapman, J. R. (Hrsg.), Humana Press, **146**: 1-16.
- Shotton, D. M. (1970) Elastase. Methods Enzymol 19: 113-140.
- Simons, G., van den Heuvel, W., Reynen, T., Frijters, A., Rutten, G., Slangen, C. J., Groenen, M., de Vos, W. M. und Siezen, R. J. (1993) Overproduction of bovine beta-casein in Escherichia coli and engineering of its main chymosin cleavage site. *Protein Eng* 6 (7): 763-770.
- Smacchi, E. und Gobbetti, M. (2000) Bioactive peptides in dairy products. Synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiol* **17** (2): 129-141.
- Smith, D. W., Brown, D. M. und Carnes, W. H. (1972) Preparation and properties of salt-soluble elastin. J Biol Chem 247 (8): 2427-2432.
- Spacek, P., Hulejova, H. und Adam, M. (1998) Simultaneous determination of pyridinium crosslinks in collagen and elastin by means of the reverse phase HPLC utilizing fluorescence monitoring. *Klinicka Biochemie a Metabolismus* 6 (3): 187-193.
- Spengler, B., Kirsch, D. und Kaufmann, R. (1991) Metastable decay of peptides and proteins in matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 5 (4): 198-202.
- Spengler, B., Kirsch, D., Kaufmann, R. und Jaeger, E. (1992) Peptide sequencing by matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 6 (2): 105-108.
- Spengler, B. (2004) De novo sequencing, peptide composition analysis, and compositionbased sequencing: a new strategy employing accurate mass determination by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom 15 (5): 703-714.
- Standing, K. G. (2003) Peptide and protein de novo sequencing by mass spectrometry. *Curr Opin Struct Biol* **13** (5): 595-601.
- Stapels, M. D. und Barofsky, D. F. (2004) Complementary use of MALDI and ESI for the HPLC-MS/MS analysis of DNA-binding proteins. *Anal Chem* 76 (18): 5423-5430.
- Starcher, B. C. und Galione, M. J. (1976) Purification and comparison of elastins from different animal species. *Anal Biochem* 74 (2): 441-447.
- Starcher, B. C. (2000) Lung elastin and matrix. Chest 117 (5 Suppl 1): 229S-234S.
- Steen, H. und Mann, M. (2004) The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5** (9): 699-711.
- Stewart, A. F., Bonsing, J., Beattie, C. W., Shah, F., Willis, I. M. und Mackinlay, A. G. (1987) Complete nucleotide sequences of bovine alpha S2- and beta-case in cDNAs: comparisons with related sequences in other species. *Mol Biol Evol* 4 (3): 231-241.

- Suckau, D. und Resemann, A. (2003) T3-sequencing: targeted characterization of the Nand C-termini of undigested proteins by mass spectrometry. *Anal Chem* 75 (21): 5817-5824.
- Svedberg, J., de Haas, J., Leimenstoll, G., Paul, F. und Teschemacher, H. (1985) Demonstration of beta-casomorphin immunoreactive materials in in vitro digests of bovine milk and in small intestine contents after bovine milk ingestion in adult humans. *Peptides* 6 (5): 825-830.
- Swinburn, B. (2004) Beta casein A1 and A2 in milk and human health. Report to the New Zealand Food Safety Authority. <u>www.nzfsa.govt.nz/policy-law/projects/a1-a2-milk</u>.
- 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 (5): 664-671.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y. und Yoshida, T. (1988) Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2 (8): 151-153.
- Tang, J. (2004) Handbook of Proteolytic Enzymes, 2. Auflage. Elsevier, London.
- Taylor, J. A. und Johnson, R. S. (1997) Sequence database searches via de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 11 (9): 1067-1075.
- Taylor, J. A. und Johnson, R. S. (2001) Implementation and uses of automated de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* **73** (11): 2594-2604.
- **Truswell, A. S.** (2005) The A2 milk case: a critical review. *Eur J Clin Nutr* **59** (5): 623-631.
- Truswell, A. S. (2006) Reply: The A2 milk case: a critical review. *Eur J Clin Nutr* 60 (7): 924-925.
- **Uitto, J., Hoffmann, H. P. und Prockop, D. J.** (1976) Synthesis of elastin and procollagen by cells from embryonic aorta Differences in role of hydroxyproline and effects of proline analogs on secretion of 2 proteins. *Arch Biochem Biophys* **173** (1): 187-200.
- Uitto, J. und Lichtenstein, J. R. (1976) Defects in the biochemistry of collagen in diseases of connective tissue. *J Invest Dermatol* 66 (02): 59-79.
- Uitto, J., Christiano, A. M., Kahari, V. M., Bashir, M. M. und Rosenbloom, J. (1991) Molecular biology and pathology of human elastin. *Biochem Soc Trans* 19 (4): 824-829.
- Umeda, H., Takeuchi, M. und Suyama, K. (2001) Two new elastin cross-links having pyridine skeleton. Implication of ammonia in elastin cross-linking in vivo. *J Biol Chem* 276 (16): 12579-12587.
- Urbán, Z., Michels, V. V., Thibodeau, S. N., Davis, E. C., Bonnefont, J. P., Munnich, A., Eyskens, B., Gewillig, M., Devriendt, K. und Boyd, C. D. (2000a) Isolated supravalvular aortic stenosis: functional haploinsufficiency of the elastin gene as a result of nonsense-mediated decay. *Hum Genet* 106 (6): 577-588.
- Urbán, Z., Peyrol, S., Plauchu, H., Zabot, M. T., Lebwohl, M., Schilling, K., Green, M., Boyd, C. D. und Csiszar, K. (2000b) Elastin gene deletions in Williams syndrome patients result in altered deposition of elastic fibers in skin and a subclinical dermal phenotype. *Pediatr Dermatol* 17 (1): 12-20.
- Urry, D. W. (1978) Molecular perspectives of vascular wall structure and disease: the elastic component. *Perspect Biol Med* **21** (2): 265-295.
- Urry, D. W., Sugano, H., Prasad, K. U., Long, M. M. und Bhatnagar, R. S. (1979) Prolyl hydroxylation of the polypentapeptide model of elastin impairs fiber formation. *Biochem Biophys Res Commun* 90 (1): 194-198.
- Valaskovic, G. A., Kelleher, N. L., Little, D. P., Aaserud, D. J. und McLafferty, F. W. (1995) Attomole-sensitivity electrospray source for large-molecule mass spectrometry. *Anal Chem* 67 (20): 3802-3805.
- Visser, S., Slangen, C. J., Lagerwerf, F. M., Van Dongen, W. D. und Haverkamp, J. (1995) Identification of a new genetic variant of bovine beta-casein using reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectrometric analysis. *J Chromatogr A* **711** (1): 141-150.

- Vorob'ev, M. M., Dalgalarrondo, M., Chobert, J. M. und Haertle, T. (2000) Kinetics of beta-case in hydrolysis by wild-type and engineered trypsin. *Biopolymers* 54 (5): 355-364.
- Vrhovski, B., Jensen, S. und Weiss, A. S. (1997) Coacervation characteristics of recombinant human tropoelastin. *Eur J Biochem* 250 (1): 92-98.
- Vrhovski, B. und Weiss, A. S. (1998) Biochemistry of tropoelastin. Eur J Biochem 258 (1): 1-18.
- 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.
- Wilm, M. und Mann, M. (1996) Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. Anal Chem 68 (1): 1-8.
- Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T. und Mann, M. (1996) Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature* 379 (6564): 466-469.
- Wilm, M. S. und Mann, M. (1994) Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *Int J Mass Spectrom Ion Processes* **136** (2-3): 167-180.
- Woodford, K. B. (2006) A critique of Truswell's A2 milk review. Eur J Clin Nutr 60 (3): 437-439.
- Yamashita, M. und Fenn, J. B. (1984a) Electrospray ion-source another variation on the free-jet theme. J Phys Chem 88 (20): 4451-4459.
- Yamashita, M. und Fenn, J. B. (1984b) Negative-ion production with the electrospray ion-source. J Phys Chem 88 (20): 4671-4675.
- Yanagisawa, H., Davis, E. C., Starcher, B. C., Ouchi, T., Yanagisawa, M., Richardson, J. A. und Olson, E. N. (2002) Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. *Nature* 415 (6868): 168-171.
- Yates, J. R., 3rd, Speicher, S., Griffin, P. R. und Hunkapiller, T. (1993) Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification. *Anal Biochem* 214 (2): 397-408.
- Yergey, A. L., Coorssen, J. R., Backlund, P. S., Jr., Blank, P. S., Humphrey, G. A., Zimmerberg, J., Campbell, J. M. und Vestal, M. L. (2002) De novo sequencing of peptides using MALDI/TOF-TOF. J Am Soc Mass Spectrom 13 (7): 784-791.
- Zhang, H., Apfelroth, S. D., Hu, W., Davis, E. C., Sanguineti, C., Bonadio, J., Mecham, R. P. und Ramirez, F. (1994) Structure and expression of fibrillin-2, a novel microfibrillar component preferentially located in elastic matrices. *J Cell Biol* 124 (5): 855-863.
- Zhang, M. C., He, L., Giro, M., Yong, S. L., Tiller, G. E. und Davidson, J. M. (1999) Cutis laxa arising from frameshift mutations in exon 30 of the elastin gene (ELN). J Biol Chem 274 (2): 981-986.
- Zhang, Z. und McElvain, J. S. (2000) De novo peptide sequencing by two-dimensional fragment correlation mass spectrometry. *Anal Chem* 72 (11): 2337-2350.

7 LEBENSLAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name:	Christian Eberhard Hubert Schmelzer
Geburtsdatum / -ort:	17. Mai 1978 in Wippra (Sachsen-Anhalt)
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	1 Tochter

SCHULBILDUNG

1984-1994	Polytechnische Oberschule bzw. Sekundarschule Wippra
1996-1997	Fachoberschule Technik, Hettstedt, Abschluss: Fachhochschulreife

BERUFSAUSBILDUNG

08/1994-06/1996	Berufsfachschule Technik, Hettstedt,
	Abschluss: Staatlich Geprüfter Technischer Assistent für Informatik

WEHRDIENST

10/1997-07/1998 PzArtBtl 2, Hessisch Lichtenau

STUDIUM

10/1998-03/2003 Studium der Physikalischen Technik und Informationsverarbeitung, Hochschule Merseburg (FH), Abschluss: Dipl.-Ing. (FH) für Physikalische Technik und Informationsverarbeitung, Gesamtnote: sehr gut

DIPLOM

03/2002-02/2003 Anfertigung einer Diplomarbeit an der Universität Gdańsk (SOCRATES-Stipendium) unter Leitung von Prof. Dr. Linde und an der Hochschule Merseburg (FH) unter Leitung von Prof. Dr. Rosenfeld mit dem Thema "*Experimentelle Untersuchungen zu molekularakustischen Eigenschaften von Mischungen aus Wasser und Nichtelektrolyten"*
WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEITEN

04/2000-07/2000	wissenschaftliche Hilfskraft am Labor für Messtechnik (Prof. Dr. Rost),
	Fachbereich Informatik und Angewandte Naturwissenschaften, Hochschule
	Merseburg (FH)
02/2003-04/2003	wissenschaftliche Hilfskraft am Labor für Ultraschalltechnik (Prof. Dr. Ro-
	senfeld), Fachbereich Informatik und Angewandte Naturwissenschaften,
	Hochschule Merseburg (FH)
04/2003-05/2007	Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. h. c. Neubert am Institut
	für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Martin-Luther-
	Universität Halle-Wittenberg
04/2003-05/2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im BMBF-Verbundprojekt
	Molekulare Ernährungsforschung (Projekt-Nr. 0312750A)
06/2005-05/2007	Stipendiat der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt

MITGLIEDSCHAFTEN IN WISSENSCHAFTLICHEN VEREINIGUNGEN

Deutsche Physikalische Gesellschaft (DPG), Fachgruppe Massenspektrometrie

Deutsche Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS)

American Society for Mass Spectrometry (ASMS)

8 PUBLIKATIONSLISTE

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften mit Gutachtersystem

Schmelzer, C. E. H., Żwirbla, W., Rosenfeld, E. und Linde, B. B. J. (2004) Acoustic investigations of pseudo-stable structures in aqueous solutions of polyethylene glycols, J *Mol Struct* **699** (1-3): 47-51.

Schmelzer, C. E. H., Schöps, R., Ulbrich-Hofmann, R., Neubert, R. H. H. und Raith, K. (2004) Mass spectrometric characterization of peptides derived by peptic cleavage of bovine β -casein. *J Chromatogr A* 1055 (1-2): 87-92.

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** (3): 649-657.

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** (1-2): 120-126.

Getie, M., Schmelzer, C. E. H., Weiss, A. S. und Neubert, R. H. H. (2005) Complementary mass spectrometric techniques to achieve complete sequence coverage of recombinant human Tropoelastin. *Rapid Comm Mass Spectrom* **19** (20): 2989-2993.

Raith, K., Schmelzer, C. E. H. und Neubert, R. H. H. (2006) Towards a molecular characterization of pharmaceutical excipients: mass spectrometric investigation of ethoxylated surfactants. *Int J Pharm* **319** (1-2): 1-12.

Jäckel, A., Schmelzer, C. E. H., Wartewig, S. und Neubert, R. H. H. (2006) Sublimation of antimycotic agents as proved by various analytical methods. *Pharmazie* **61** (12): 1045-1047.

Huenerbein, A., Schmelzer, C. E. H. und Neubert, R. H. H. (2007) Real-time monitoring of peptic and tryptic digestions of bovine β -casein using quartz crystal microbalance. *Anal Chim Acta*, **584** (1): 72-77.

Farwanah, H., Pierstorff, B., Schmelzer, C. E. H., Raith, K., Neubert, R. H. H., Kolter, T. und Sandhoff, K. (2007) Separation and mass spectrometric characterization of covalently bound skin ceramides using LC/APCI-MS and Nano-ESI-MS. *J Chromatogr B*, **852** (1-2): 562-570.

Schmelzer, C. E. H., Schöps, R., Reynell, L., Ulbrich-Hofmann, R., Neubert, R. H. H. und Raith, K. (2007) Peptic digestion of β -casein: The time course and the fate of possible bioactive peptides. *J Chromatogr A*, eingereicht.

Weitere Veröffentlichungen

Schmelzer, C. E. H. (2003) Experimentelle Untersuchungen zu molekularakustischen Eigenschaften von Mischungen aus Wasser und Nichtelektrolyten. *Diplomarbeit*, Hochschule Merseburg (FH).

Schmelzer, C. E. H., Rosenfeld, E. und Linde, B. B. J. (2003) Acoustical investigation of pseudo-stable structures in aqueous mixtures of polyethylene glycol. *Proceedings of the* 5th World Congress on Ultrasonics (Paris 2003): 1373-1375.

Linde, B. B. J., Schmelzer, C. E. H., Rosenfeld, E. und Żwirbla, W. (2004) Ultrasonic investigation of some water mixtures with non-electrolytes. *Proceedings of the International Congress of Acoustics (Kyoto 2004)*: 2609-2610.

Schöps, R., Körting, R., Naß, N. und C. E. H. Schmelzer (2005) Physiological-like food protein hydrolysates: a strategy to identify peptides modulating atherosclerosis-relevant factors. *NAFAS* **3**: 59-64.

Ausgewählte Abstracts

Linde, B., Schmelzer, C. und Rosenfeld, E. (2002) Ultrasonic investigations of water mixtures with polyethylene glycol 1000. *J. Acoust. Soc. Am.* **112** (5): 2440.

Getie, M., Schmelzer, C. E. H. und Neubert, R. H. H. (2004) Identification of amino acid sequences for some peptides resulting from enzymatic digestion of human skin Elastin. *Matrix Biology* **23** (6): 402.

Tagungsbeiträge

Schmelzer, C. E. H., Raith, K., Schöps, R. und Neubert, R. H. H. (2004) Application of new tools for optimizing the peak detection in MALDI-PSD and ESI-tandem mass spectrometry data for an improvement of the identification quota of peptides from protein hydrolysates. *37. Diskussionstagung der DGMS*, Leipzig.

Raith, K., Schmelzer, C. E. H., Schöps, R. und Neubert, R. H. H. (2004) Hydrolysate von Nahrungsproteinen mit Proteasen unterschiedlicher Spezifität: Kombinierter Einsatz von MALDI-PSD und ESI-MS/MS zur Identifizierung von Casein-Fragmenten. *37. Diskussionstagung der DGMS*, Leipzig.

Getie, M., Schmelzer, C. E. H. und Neubert, R. H. H. (2004) Identification of amino acid sequences for some peptides resulting from enzymatic digestion of human skin elastin using LC/MS/MS. *Third European Symposium ELASTIN 2004*, Manchester.

Schmelzer, C. E. H., Raith, K. und Neubert, R. H. H. (2004) Analytische Charakterisierung von Peptiden aus Proteinverdauen. *BMBF-Statusseminar "Molekulare Ernährungsforschung"*, Berlin. Schöps, R., Körting, R., Naß, N., Schmelzer, C. und Ulbrich-Hofmann, R. (2004) Physiological-like food protein hydrolysates: A strategy to identify peptides modulating atherosclerosis-relevant factors. *Health Food Symposium SAS 2004*, Toulouse, Frankreich.

Schmelzer, C. E. H., Huenerbein, A., Raith, K. und Neubert, R. H. H. (2005) MALDI imaging of proteins and their interaction partners on surfaces. *38. Diskussionstagung der DGMS*, Rostock.

Getie, M., Schmelzer, C. E. H., Weiss, A. S. und Neubert, R. H. H. (2005) Mass spectrometric characterization of peptides resulting from enzymatic digestion of recombinant human Tropoelastin. *38. Diskussionstagung der DGMS*, Rostock.

Raith, K., Farwanah, H., Brenner, C., Schmelzer, C. E. H. und Neubert, R. H. H. (2005) LC/APCI-MS in lipid analysis. *38. Diskussionstagung der DGMS*, Rostock.

Raith, K., Farwanah, H., Schmelzer, C. E. H. und Neubert, R. H. H. (2005) Tandem mass spectrometric investigation of esterified stratum corneum ceramides. 53nd ASMS Conference, San Antonio, TX, USA.

Schmelzer, C. E. H., Getie, M., Raith, K. und Neubert, R. H. H. (2005) Identification of peptides from enzymatic digestion of human skin elastin by nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *53nd ASMS Conference*, San Antonio, TX, USA.

Getie, M., Schmelzer, C. E. H. und Neubert, R. H. H. (2005) Determination of the positions of hydroxylated prolines in human skin elastin using mass spectrometry. *Gordon Research Conference on Elastin and Elastic Fibers*, Waterville Valley, NH, USA.

Huenerbein, A., Schmelzer, C. E. H. und Neubert, R. H. H. (2005) Quartz crystal microbalance for on-line investigations of enzymatic reactions on dietary proteins. 6^{th} World Congress on Ultrasonics - Ultrasonics International, Beijing, China.

Raith, K., Schmelzer, C. E. H., Huenerbein, A. und Neubert, R. H. H. (2005) MALDI Imaging: Neue Perspektiven in der Pharmazeutischen Forschung. *Jahrestagung der DPhG*, Mainz.

Raith, K., Schmelzer, C. E. H. und Neubert, R. H. H. (2005) Towards a molecular characterization of pharmaceutical excipients: mass spectrometric studies, of ethoxylated surfactants. *The First European Congress on Life Science Process Technology in conjunction with TechnoPharm*, Nürnberg.

Farwanah, H., Pierstorff, B., Brodesser, S., Schmelzer, C. E. H., Raith, K., Neubert, R. H. H. und Sandhoff, K. (2006) Normal phase LC/APCI-MS for separation and profiling of stratum corneum ceramides in skin and keratinocytes. *3. Symposium der DFG-Forschergruppe "Keratinocyten"*, Bonn.

Schmelzer, C. E. H., Schöps, R., Reynell, L., Neubert, R. H. H. und Raith, K. (2006) Gastro-analogous *in vitro* digestion of bovine β -casein as studied by nano-ES-MS/MS and MALDI-PSD. *54nd ASMS Conference*, Seattle, WA, USA.

Schmelzer, C. E. H., Reynell, L., Schöps, R., Neubert, R. H. H. und Raith, K. (2006) The time course of peptic digestion of β -casein as studied by LC/MALDI and nanoES mass spectrometry. *HPLC 2006: 30th International Symposium & Exhibit on High Performance Liquid Phase Separations & Related Techniques*, San Francisco, CA, USA.

Raith, K., Schmelzer, C. E. H., Reynell, L., Schöps, R. und Neubert, R. H. H. (2006) Studies on the digestion of β -casein: how likely is the formation of bioactive peptides? *DPhG Joint Meeting*, Marburg.

Raith, K., Schmelzer, C. E. H. und Neubert, R. H. H. (2007) Mass spectrometric characterization of ethoxylated surfactants. *4th Polish-German Symposium*, Halle (Saale).

Taddese, S., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H. (2007) Degradation of human skin elastin by a major elastinolytic matrix metalloproteinase. 4th Polish-German Symposium, Halle (Saale).

Taddese, S., Neubert, R. H. H. und Schmelzer, C. E. H. (2007) Mass spectrometric characterization of the elastolytic properties of human macrophage elastase (MMP-12) on human skin elastin. 55^{nd} ASMS Conference, Indianapolis, IN, USA.

9 ANHANG: DER DISSERTATIONSSCHRIFT ZU GRUNDE LIEGEN-DE VERÖFFENTLICHUNGEN

- 9.1 Schmelzer, C. E. H., Schöps, R., Ulbrich-Hofmann, R, Neubert, R. H. H., Raith, K. (2004) Mass spectrometric characterization of peptides derived by peptic cleavage of bovine β-casein. *J Chromatogr A* 1055 (1-2): 87-92.
- 9.2 Schmelzer, C. E. H., Schöps, R., Reynell, L., Ulbrich-Hofmann, R, Neubert, R. H. H., Raith, K. (2007) Peptic digestion of β-casein: The time course and the fate of possible bioactive peptides. *J Chromatogr A*, eingereicht.
- 9.3 Huenerbein, A., Schmelzer, C. E. H., Neubert, R. H. H. (2007) Real-time monitoring of peptic and tryptic digestions of bovine β-casein using quartz crystal microbalance. *Anal Chim Acta* 584 (1): 72-77.
- 9.4 Getie M., Schmelzer, C. E. H., Weiss, A. S., Neubert, R. H. H. (2005) Complementary mass spectrometric techniques to achieve complete sequence coverage of recombinant human Tropoelastin. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19 (20): 2989-2993.
- 9.5 Schmelzer, C. E. H., Getie, M. 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 (1-2): 120-126.
- 9.6 Getie, M, Schmelzer, C. E. H., Neubert, R. H. H. (2005) Characterization of peptides resulting from digestion of human skin elastin with elastase. *Proteins* 61 (3): 649-657.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich gemäß §5 Absatz 2b der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die vorgelegte Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Christian Schmelzer

Halle (Saale), 20.02.2007