

Entwicklung und Anwendung
massenspektrometrischer Methoden zur
Analyse von proteasekatalysierten
Reaktionen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Joanna Tucher

2015

Erster Gutachter: Prof. Dr. Andreas Tholey

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Oktober 2015

Zum Druck genehmigt: 1. Oktober 2015

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer *PROF. DR. ANDREAS THOLEY* für die Bereitstellung der interessanten und vielseitigen Fragestellungen sowie die engagierte Unterstützung während meiner Promotionsarbeit bedanken. Das entgegengebrachte Vertrauen und die freundliche Zusammenarbeit haben stets zu einem kreativen und äußerst angenehmen Arbeitsumfeld beigetragen, wofür ich ihm sehr dankbar bin.

Bei *PROF. DR. THOMAS ROEDER* möchte ich mich herzlich dafür bedanken, dass er sich dazu bereit erklärt hat, das Zweitgutachten meiner Dissertation anzufertigen.

PROF. DR. CHRISTOPH BECKER-PAULY danke ich vielmals für die gemeinsam bearbeiteten Projekte. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei den weiteren Mitgliedern des Forschungsprojektes A9 des SFB 877, insbesondere bei *DR. CLAUDIA TREDUP*, *FELIX JÄCKLE* und *RIELANA WICHERT*, für die exzellente Zusammenarbeit bedanken.

Vielen Dank auch an *KIRSTEN MEINHARDT* für die engagierte Unterstützung in bürokratischen Angelegenheiten.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe von *PROF. DR. ANDREAS THOLEY* für ihre alltägliche Motivation und Hilfsbereitschaft, aber auch für die entstandenen Freundschaften und die schöne gemeinsame Zeit, ob in der Kaffeepause oder im Schrevenpark, bedanken. Danke an *ALEXANDER BECKER*, *DR. LIAM CASSIDY*, *DR. TOMAS KOUDELKA*, *DR. DENNIS LINKE*, *JANA SCHLENK*, *PRASATH SOMASUNDARAM* und *CHRISTIAN TREITZ*. Auch bei den ehemaligen Mitarbeitern *DR. CHIEN-WEN HUNG* und *DR. THOMAS JAKOBY-GREGORIUS* möchte ich mich in diesem Sinne ganz herzlich bedanken. Hervorheben möchte ich *DR. TOMAS KOUDELKA*, meinen Kollegen im Forschungsprojekt Z2 des SFB 877, dem ich für seine allseits kompetente Beratung und Unterstützung sowie die geduldigen wissenschaftlichen Diskussionen sehr dankbar bin.

Zudem möchte ich mich bei *ALEX*, *BENNI*, *BINE*, *LILLY*, *LUKAS*, *MANJA*, *MARCEL* und *MARIE* für die wöchentlichen erfrischenden Mittagspausen im Schleswig-Holsteinischen Landtag bedanken.

Ein großes Dankeschön richte ich an meine Eltern, *DANUTA* und *BERNHARD*, und an meinen Freund *STEFAN* für ihre liebevolle Unterstützung und alle Freiheiten, die sie mir ermöglicht haben. Ebenso möchte ich mich bei meinen *FREUNDEN* aus der Heimat und denen aus Erlanger Zeiten, nicht nur für ihre zahlreichen Besuche im hohen Norden, sondern auch für die vielseitige Abwechslung vom Alltag in der Wissenschaft bedanken.

In gleicher Weise möchte ich mich natürlich auch bei allen in Kiel neu gewonnenen Freunden bedanken.

VIELEN DANK.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Joanna Tucher
Geburtsdatum: 01.11.1987
Geburtsort: Nürnberg
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

09/1998 – 06/2007: Friedrich-Alexander-Gymnasium in Neustadt an der Aisch
(Allgemeine Hochschulreife)

Hochschulstudium

10/2007 – 03/2012: Lebensmittelchemie an der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg (Staatsexamen)

10/2011 – 03/2012: Wissenschaftliche Abschlussarbeit zum Thema „Unter-
suchung der zellulären Expression von Hämoxygenase-1
mittels UHPLC-MS/MS“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr.
Monika Pischetsrieder am Henriette Schmidt-Burkhardt
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Friedrich-Alexander-
Universität Erlangen-Nürnberg

Promotion

04/2012 – 07/2015: Promotionsarbeit zum Thema „Entwicklung und Anwen-
dung massenspektrometrischer Methoden zur Analyse von
proteasekatalysierten Reaktionen“ in der Arbeitsgruppe von
Prof. Dr. Andreas Tholey am Institut für Experimentelle
Medizin der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel inner-
halb des Sonderforschungsbereiches 877 „*Proteolysis as a
Regulatory Event in Pathophysiology*“ der Deutschen
Forschungsgemeinschaft

Publikationsliste

Teile dieser Dissertation finden sich in folgenden Veröffentlichungen wieder:

Joanna Tucher, Dennis Linke, Tomas Koudelka, Liam Cassidy, Claudia Tredup, Rielana Wichert, Claus Pietrzik, Christoph Becker-Pauly & Andreas Tholey (2014)

LC-MS BASED CLEAVAGE SITE PROFILING OF THE PROTEASES ADAM10 AND ADAM17 USING PROTEOME-DERIVED PEPTIDE LIBRARIES.

in: Journal of Proteome Research, 13, 2205-14.

Joanna Tucher, Tomas Koudelka, Jana Schlenk & Andreas Tholey

FROM TOP-DOWN TO BOTTOM-UP: TIME-DEPENDENT MONITORING OF PROTEOLYTIC PROTEIN DEGRADATION OVER TIME BY LC-MS.

eingereicht

Mitwirkung und Veröffentlichungen zusätzlich zu den Teilen dieser Dissertation:

Nina Zänglein, Joanna Tucher & Monika Pischetsrieder (2015)

TARGETED MASS SPECTROMETRY FOR THE ANALYSIS OF NUTRITIVE MODULATION OF CATALASE AND HEME OXYGENASE-1 EXPRESSION.

in: Journal of Proteomics, 117, 58-69.

Buchkapitel:

Joanna Tucher, Prasath Somasundaram & Andreas Tholey

QUANTITATIVE MALDI MS USING IONIC LIQUID MATRICES.

in: Advances in MALDI and Laser-induced Soft Ionization Mass Spectrometry

Editor: Rainer Cramer

Verlag: Springer

eingereicht

Tagungsbeiträge

Posterbeiträge

CLEAVAGE-SITE PROFILING OF THE PROTEASES ADAM10 AND ADAM17.

7th European Summer School “Advanced Proteomics”, August 2013, Brixen, Italien

DECIPHERING THE CLEAVAGE SITE SPECIFICITY OF THE SHEDDASES ADAM10 AND ADAM17.

13th Human Proteome Organization (HUPO) World Congress, Oktober 2014, Madrid, Spanien

DECIPHERING THE CLEAVAGE SITE SPECIFICITY OF THE SHEDDASES ADAM10 AND ADAM17.

Inflammation at Interfaces, International 5th Annual Cluster Symposium, März 2015, Kiel, Deutschland

Preise

Posterpreis (2. Platz)

DECIPHERING THE CLEAVAGE SITE SPECIFICITY OF THE SHEDDASES ADAM10 AND ADAM17.

Inflammation at Interfaces, International 5th Annual Cluster Symposium, März 2015, Kiel, Deutschland

Abkürzungsverzeichnis

2D-GE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
2D-DIGE	Zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese
ABC	Ammoniumbicarbonat
ACN	Acetonitril
ADAM	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase</i> (z. B. ADAM10, ADAM17)
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATOMS	<i>Amino-terminal Oriented Mass Spectrometry of Substrates</i>
BACE1	<i>β-Site of APP Cleaving Enzyme</i>
BCA	Bicinchoninsäure
ChaFRADIC	<i>Charge-based Fractional Diagonal Chromatography</i>
CHCA	<i>α-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid, α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure</i>
CID	<i>Collision-induced Dissociation,</i> Kollisions-induzierte Fragmentierung
COFRADIC	<i>Combined Fractional Diagonal Chromatography</i>
C-TAILS	<i>C-Terminal Amine-based Isotope Labeling of Substrates</i>
Ebola GP	Ebola Glykoprotein
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization, Elektrospray-Ionisierung</i>
ETD	<i>Electron Transfer Dissociation</i>
ETHcD	<i>Electron Transfer Higher Energy Dissociation</i>
FA	<i>Formic Acid, Ameisensäure</i>
FDR	<i>False Discovery Rate, Falsch-positiv Rate</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
FT-ICR	Fouriertransformations-Ionencyclotronresonanz
GELFrEE	<i>Gel-eluted Liquid Fraction Entrapment Electrophoresis</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HCD	<i>Higher Energy Collisional Dissociation</i>
HCl	Salzsäure, Hydrochlorid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography,</i> Hochdruckflüssigchromatographie
IAA	Iodacetamid
i.D.	Innerer Durchmesser
IL-6	Interleukin-6
iTRAQ	<i>Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification</i>
LC	<i>Liquid Chromatography,</i> Flüssigchromatographie
LTQ	<i>Linear Trap Quadrupole,</i> Lineare Quadrupol-Ionenfalle
LYZ	Lysozym
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption Ionization,</i> Matrix-gestützte Laserdesorptions-Ionisierung
Meprin	<i>Metalloprotease from Renal Tissue</i>
MGF	<i>Mascot Generic Format</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease (z. B. MMP-2)
MS	Massenspektrometrie, massenspektrometrisch
MS1	MS-Ebene
MS2	MS/MS-Ebene
MudPIT	<i>Multidimensional Protein Identification Technology</i>
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge, Natriumhydroxid
NCE	<i>Normalized Collision Energy,</i> Normalisierte Kollisionsenergie
N-CLAP	<i>N-Terminalomics by Chemical Labeling of the α-Amine of Proteins</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PC7	<i>Proprotein Convertase 7</i>
PICS	<i>Proteomic Identification of Protease Cleavage Sites</i>
PLK2	<i>Polo-like Kinase 2</i>
<i>P_n</i>	Position der <i>non-prime</i> Sequenz (z. B. P1)
<i>P_n'</i>	Position der <i>prime</i> Sequenz (z. B. P1')
PNGase F	Peptid-N-Glykosidase F
ppm	<i>Parts per Million</i> (10^{-6})
ProC-TEL	<i>Protein C-Termini by Enzymatic Labeling</i>
PrP ^C	Zelluläres Prion-Protein
PSM	<i>Peptide Spectrum Match</i>

PS-SCL	<i>Positional-Scanning Synthetic Combinatorial Libraries</i>
PTM	Posttranslationale Modifikation
Q-PICS	<i>Quantitative Proteomic Identification of Protease Cleavage Sites</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
RP	<i>Reversed Phase</i> , Umkehrphase
rhIL-6	Rekombinantes humanes Interleukin-6
rh(MAP)IL-6	Rekombinantes humanes Interleukin-6 (¹ MAPVPPG...ALRQM ¹⁸⁶)
rh(P)IL-6	Rekombinantes humanes Interleukin-6 (¹ PVPPG...ALRQM ¹⁸⁴)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sIL-6R	Löslicher Interleukin-6-Rezeptor
SILAC	<i>Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture</i>
SP1	Meprin- β -generiertes C-terminales Spaltprodukt 1 aus rhIL-6 (⁶ EDSKD...ALRQM ¹⁸⁴ , Nummerierung bezogen auf rh(P)IL-6)
SP2	Meprin- β -generiertes C-terminales Spaltprodukt 2 aus rhIL-6 (⁷ DSKDV...ALRQM ¹⁸⁴ , Nummerierung bezogen auf rh(P)IL-6)
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> , Festphasenextraktion
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i>
TACE	<i>Tumor Necrosis Factor α-Converting Enzyme</i>
TAILS	<i>Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	<i>Total Ion Current</i> , Totalionenstrom
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i> (z. B. TIMP1)
TMT	<i>Tandem Mass Tag</i>
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TOF	<i>Time of Flight</i> , Flugzeit-Analysator
Tricin	N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
UV	Ultraviolett

VBA	<i>Visual Basic for Applications</i>
v/v	<i>Volume/Volume, Volumen/Volumen</i>
w/v	<i>Weight/Volume, Masse/Volumen</i>
w/w	<i>Weight/Weight, Masse/Masse</i>
XIC	<i>Extracted Ion Chromatogram, Extrahiertes Ionenchromatogramm</i>

Abkürzungsverzeichnis proteinogener Aminosäuren

Einbuchstaben-Code, Dreibuchstaben-Code, Aminosäure

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure, Aspartat
E	Glu	Glutaminsäure, Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung	5
3.1	Proteasen – Weit verbreitete Enzyme	5
3.2	Die proteolytische Reaktion – Klassifizierung von Proteasen	6
3.3	Proteolytische Netzwerke	8
3.4	Fragestellungen rund um proteolytische Reaktionen	10
3.5	Analytik proteolytischer Reaktionen	11
3.5.1	Biochemische, zellbiologische Methoden und Tiermodelle	11
3.5.2	Methoden unter Zuhilfenahme der Massenspektrometrie	13
4	Zielsetzung der Arbeit	22
5	Bestimmung der Spaltspezifität von ADAM10 und ADAM17	23
5.1	Einleitung	23
5.1.1	ADAM10 und ADAM17	23
5.1.2	Die Q-PICS Methode	25
5.2	Material und Methoden	27
5.2.1	Chemikalien	27
5.2.2	Expression und Aufreinigung von ADAM10 und ADAM17	27
5.2.3	Extraktion von zytosolischem Hefeprotein	28
5.2.4	Herstellung der Lys-C und Glu-C Peptidbibliotheken	28
5.2.5	TMT-6plex-Experimente mit ADAM10/17	29
5.2.6	Kontrollen der Peptidbibliotheken	29
5.2.7	LC-MALDI TOF/TOF MS	30
5.2.8	LC-ESI LTQ Orbitrap MS	31
5.2.9	Auswertung der Daten	32
5.3	Ergebnisse und Diskussion	35
5.3.1	Analytische Strategie	35
5.3.2	Spaltspezifität von ADAM10 und ADAM17	39
5.3.3	LC-MALDI und LC-ESI MS	48
5.4	Ausblick	53

6	Von <i>Top-down</i> zu <i>Bottom-up</i>: Zeitaufgelöste Analyse proteolytischer Reaktionen	57
6.1	Einleitung.....	57
6.1.1	Zeitaufgelöste Analyse proteolytischer Reaktionen	57
6.1.2	Das Modellsystem – Pepsin und Lysozym	58
6.2	Material und Methoden	60
6.2.1	Chemikalien	60
6.2.2	Optimierung der LC-Säulenkombination	61
6.2.3	Verdau von Lysozym mit Pepsin.....	62
6.2.4	Tricin-SDS-PAGE	62
6.2.5	LC-ESI LTQ Orbitrap MS	63
6.2.6	Auswertung der Daten	65
6.3	Ergebnisse und Diskussion	66
6.3.1	Analytische Strategie	66
6.3.2	Optimierung der LC-Säulenkombination	67
6.3.3	Tricin-SDS-PAGE Analyse des Pepsin-Verdau von Lysozym	72
6.3.4	LC-MS Analyse des Pepsin-Verdau von Lysozym	75
6.4	Ausblick	87
7	<i>Top-down</i> Identifizierung der Meprin-α/β Spaltstellen in Interleukin-6	90
7.1	Einleitung.....	90
7.1.1	Meprin- α , Meprin- β und Interleukin-6.....	90
7.1.2	<i>Top-down</i> Massenspektrometrie.....	91
7.2	Material und Methoden	93
7.2.1	Chemikalien	93
7.2.2	Probenbeschreibung.....	93
7.2.3	Probenvorbereitung zur <i>offline</i> ESI LTQ Orbitrap MS.....	93
7.2.4	<i>Offline</i> ESI LTQ Orbitrap MS	94
7.2.5	<i>Online</i> LC-ESI LTQ Orbitrap MS.....	94
7.2.6	Auswertung der Daten	95
7.3	Ergebnisse und Diskussion	96
7.3.1	Analytische Strategie	96
7.3.2	Meprin- α/β Spaltstellen in Interleukin-6	97
7.4	Ausblick	111

8	Literaturverzeichnis	113
9	Anhang	129
9.1	Anhang Kapitel 5	129
9.2	Anhang Kapitel 6	143
9.3	Anhang Kapitel 7	146

1 Zusammenfassung

Proteasen übernehmen zentrale Funktionen in den verschiedensten physiologischen und pathologischen Prozessen, weshalb ein möglichst umfangreiches Wissen um die hydrolytischen Enzyme und um deren proteolytische Netzwerke von großem Interesse für die Entwicklung neuer Krankheitstherapien ist. Analytische Fragestellungen befassen sich in diesem Zusammenhang folglich mit der Identifizierung und Charakterisierung von Proteasen, zugehörigen Substraten oder Spaltprodukten sowie mit der Aufklärung regulatorischer Mechanismen. Die Massenspektrometrie gewann in den letzten Jahren auch im Bereich der Proteasenforschung zunehmend an Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurden auf dieser Technologie basierende und zur Analyse von proteasekatalysierten Reaktionen geeignete Methoden in drei verschiedenen Projekten entwickelt und angewendet.

Im ersten Projekt wurden die Spaltspezifitäten von rekombinantem ADAM10 (*A Disintegrin and Metalloproteinase 10*) und ADAM17 mithilfe von proteombasierten Peptidbibliotheken untersucht. Hierfür wurde der vorhergehend etablierte Q-PICS Ansatz (*Quantitative Proteomic Identification of Protease Cleavage Sites*) verwendet und optimiert. Um die Zuordnung falsch-positiver Spaltstellen zu vermeiden, wurde beispielsweise der Einsatz von Kontrollen der Peptidbibliotheken implementiert. Es wurden zwei komplementäre Technologien der Massenspektrometrie eingesetzt, MALDI MS und ESI MS, wodurch die Anzahl identifizierter Spaltstellen erhöht und damit einhergehend die statistische Sicherheit der Ergebnisse verbessert werden konnte.

Insgesamt wurden 583 Spaltstellen für ADAM10 und ADAM17 identifiziert. Der größte Unterschied in der Spaltspezifität der nahe miteinander verwandten Proteasen wurde dabei hinsichtlich der P1' Position festgestellt. Während beide Proteasen hier Leucin bevorzugen, zeigt ausschließlich ADAM10 eine Präferenz für Peptidbindungen mit aromatischen Aminosäuren an dieser Position. ADAM17 hydrolysiert hingegen vorzugsweise Peptidbindungen N-terminal von Valin. An der P1 Position wurden sowohl für ADAM10 als auch für ADAM17 vor allem Prolin, Alanin und basische Aminosäuren beobachtet.

In einem zweiten Projekt wurde eine kombinierte *Top-down* und *Bottom-up* LC-MS Strategie zur zeitaufgelösten Analyse einer proteasekatalysierten Reaktion etabliert. Diese erlaubt sowohl die Entwicklung des intakten Substrates als auch die der Spaltprodukte höheren, mittleren und niedrigeren Molekulargewichtes massenspektrometrisch zu verfolgen. Außerdem können auf diese Weise intermediär auftretende Spaltprodukte und potentiell bevorzugte Spaltstellen identifiziert werden.

Die Methode wurde exemplarisch auf die im Magensaft enthaltene Protease Pepsin und das Hühnereiweißallergen Lysozym angewendet. Hierbei wurde ein schützender Effekt von Disulfidbrücken gegenüber der proteolytischen Verdaubarkeit beobachtet.

In einem dritten Projekt wurden die durch Meprin- α/β generierten Spaltstellen im Zytokin Interleukin-6 mittels *Top-down* Massenspektrometrie bestimmt. Es wurden zwei analytische Strategien angewendet und miteinander verglichen: *offline* ESI MS und *online* LC-ESI MS.

Während für Meprin- β zwei Spaltstellen im N-terminalen Bereich des Substrates identifiziert wurden, wurde für Meprin- α hauptsächlich das intakte Substrat beobachtet.

2 Summary

Proteases are key mediators in a variety of physiological and pathological processes. For this reason these hydrolytic enzymes present an interesting target for the development of novel drugs. First steps towards this direction are the identification and characterization of proteases, corresponding substrates and cleavage products as well as the elucidation of regulatory mechanisms within the protease web. Mass spectrometry-based strategies have become increasingly important in this context within the last years. The present work focuses on the development and application of mass spectrometry-based methods with regard to three different projects.

In the first project the cleavage site specificities of recombinant ADAM10 (a disintegrin and metalloproteinase 10) and ADAM17 were assessed through the employment of proteome-derived peptide libraries. For that purpose the previously established Q-PICS strategy (quantitative proteomic identification of protease cleavage sites) was applied and optimized. Controls were implemented to prevent the assignment of false-positive cleavage sites. To increase the total number of identified cleavage sites and concordantly improve the reliability of results, two complementary mass spectrometry technologies were used in parallel: MALDI MS and ESI MS.

Overall 583 cleavage sites were identified for ADAM10 and ADAM17, with the major difference between the closely related metalloproteinases exhibited at the P1' site. Whereas both proteases preferred leucine at P1', only ADAM10 showed a tendency for aromatic amino acids at this position. ADAM17 preferentially hydrolyzed peptide bonds N-terminal of valine. At the P1 site a preference for proline, alanine and basic residues was observed.

In a second project a combined top-down and bottom-up LC-MS strategy for the time-resolved monitoring of protease-catalyzed reactions was established. The method allows for the simultaneous observation of the intact substrate and protease-generated cleavage products by mass spectrometry. Importantly, the analysis of multiple time-points enables the identification of intermediate cleavage products and potentially preferred cleavage sites.

The method was applied to the gastric protease pepsin and hen egg white lysozyme, which is one of the major egg allergens, as the physiological substrate. Hereby a protective effect of disulfide-linkages against proteolysis was observed.

The third project focused on the identification of meprin- α/β cleavage sites in the cytokine interleukin-6 by top-down mass spectrometry. Two analytical approaches were applied and compared: offline ESI MS and online LC-ESI MS.

Whereas for meprin- β two cleavage sites within the N-terminal region of the substrate were identified, for meprin- α predominantly the intact substrate was observed.

3 Einleitung

3.1 Proteasen – Weit verbreitete Enzyme

Proteasen, auch bekannt als Peptidasen, Proteinasen oder proteolytische Enzyme, katalysieren die Hydrolyse von Peptidbindungen in Proteinen und Peptiden. Sie sind wichtige Schlüsselmoleküle in Pflanzen, Bakterien, Pilzen, Tieren oder auch Viren [1–5]. Das menschliche Genom kodiert für 553 Proteasen [6]. Die Enzyme übernehmen zentrale Funktionen in den verschiedensten physiologischen Prozessen, von der embryonalen Entwicklung, der Blutgerinnung, der gastro-intestinalen Verdauung von Nahrungsproteinen, der Regulation des Hormonhaushaltes oder der Kontrolle des Immunsystems bis hin zum programmierten Zelltod [7–12]. In der Konsequenz kann sich eine Fehlregulation oder veränderte Expression bestimmter Proteasen gravierend auf den Gesundheitszustand eines Organismus auswirken. Die Entwicklung auf dieser Tatsache basierender neuer Krankheitstherapien erfordert deshalb ein möglichst genaues Verständnis proteolytischer Vorgänge [13].

In der Forschung besitzen Proteasen einen hohen Stellenwert als molekulare Werkzeuge. Kollagenase oder Trypsin werden beispielsweise neben mechanischen Methoden zur Vereinzelung von Zellen aus Gewebestrukturen in der Zellkultur verwendet [14]. Auch in der massenspektrometrischen Proteinanalytik ist der proteolytische Verdau als Hilfsmittel nicht wegzudenken, da die Messung von intakten Proteinen trotz stetiger technologischer Verbesserung in vielen Fällen eine Herausforderung darstellt [15].

Auch in verschiedenen Bereichen der Biotechnologie werden Proteasen vermehrt eingesetzt. In der Lebensmittelindustrie werden beispielsweise die pflanzlichen Proteasen Bromelain oder Papain zur Zartmachung von Fleisch oder zur Verbesserung der Teigbeschaffenheit von Backwaren verwendet [16]. Als Waschmittelzusatz dienen die Enzyme hingegen der Erhöhung der Reinigungskraft [17].

3.2 Die proteolytische Reaktion – Klassifizierung von Proteasen

Proteasen zählen, wie Esterasen oder Glykosidasen, zu den hydrolytischen Enzymen (Hydrolasen). Entsprechend der *Enzyme Commission* (EC) Klassifizierung wurden Proteasen der Hauptklasse 3 (Hydrolasen) und der Unterklasse 4 (Hydrolyse von Peptidbindungen) zugeordnet [18]. Vereinfacht kann eine proteolytische Reaktion durch den Einbau eines Wassermoleküls in die Amidbindung zwischen zwei Aminosäuren (Peptidbindung) beschrieben werden (Abb. 1).

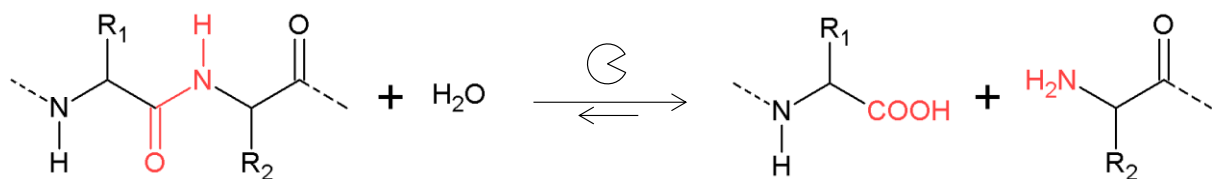


Abb. 1: Formale Reaktionsgleichung der Hydrolyse einer Peptidbindung katalysiert durch eine Protease.

Der katalytische Mechanismus dahinter ist jedoch komplexer als die formale Reaktionsgleichung vermuten lässt und hängt unter anderem vom Aufbau des aktiven Zentrums der Protease ab. Deshalb werden Proteasen typischerweise anhand der an der Katalyse beteiligten funktionellen Gruppen eingeteilt (Tabelle 1).

Während bei Cystein-, Serin- und Threoninproteasen die Thiol- bzw. Hydroxylgruppe des aktiven Zentrums den nukleophilen Angriff an der Carbonylfunktion der Amidbindung ausübt, sind es bei Aspartat- sowie Metalloproteasen Wassermoleküle, die durch die Carboxylfunktion bzw. das komplexierte Metallion aktiviert werden. Typischerweise sind mehrere Aminosäuren am aktiven Zentrum einer Protease beteiligt. Beispielsweise zeichnen sich Serinproteasen, wie z. B. Trypsin, durch die sogenannte katalytische Triade, bestehend aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure, aus [19]. Das Zusammenspiel dieser drei Aminosäuren, beginnend mit dem nukleophilen Angriff der Hydroxylfunktion von Serin an der Carbonylgruppe der Peptidbindung, ermöglicht über verschiedene durch die anderen beiden Aminosäuren des aktiven Zentrums stabilisierte Zwischenstufen, die Hydrolyse einer Peptidbindung. Bei der im menschlichen Genom mit 186 Vertretern [6] umfangreichsten katalytischen Proteaseklasse handelt es sich um Metalloproteasen. Diese enthalten ein im aktiven Zentrum durch Aminosäureliganden komplex gebundenes Metallion (meist Zn^{2+}), welches für die Aktivierung des an der Peptidbindung angreifenden Wassermoleküls

verantwortlich ist. Kapitel 5 befasst sich mit zwei Vertretern dieser Klasse, den Transmembranproteasen ADAM10 und ADAM17.

Tabelle 1: Klassifizierung von Proteasen nach dem aktiven Zentrum. Informationen zur Anzahl der Vertreter im menschlichen Genom aus [6]. Fett: nicht-humane Proteasen. Informationen zu Inhibitoren aus [20]. Der Asteriskus kennzeichnet Inhibitoren, die gegen alle Vertreter der entsprechenden Klasse wirksam sind. Abkürzungen: APMA, Aminophenylmercuric acetate (engl.); TLCK, Tosyl-lysyl-chloromethyl-Keton; TPCK, Tosyl-phenylalanyl-chloromethyl-Keton; EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid (engl.); PMSF, Phenylmethylsulfonylfluorid.

Katalytische Klasse	Anzahl der Vertreter im menschlichen Genom	Nukleophil zum Angriff an der Peptidbindung	Beispiele für Proteasen	Beispiele für Inhibitoren
Aspartatproteasen	21	Aktiviertes Wassermolekül	Pepsin, Renin, Cathepsin D	Pepstatin A*
Cysteinproteasen	143	Cystein	Caspase-2, Caspase-9, Bromelain, Papain	APMA*, TLCK, TPCK
Metalloproteasen	186	Aktiviertes Wassermolekül	ADAM10, ADAM17, Meprin- α , Meprin- β	EDTA*
Serinproteasen	176	Serin	Trypsin, Chymotrypsin, Lys-C, Glu-C	PMSF*, TLCK, TPCK
Threoninproteasen	27	Threonin	Untereinheiten des Proteasoms	Epoxomicin*

Entsprechend der Position der hydrolysierten Peptidbindung, zwischen endständigen Aminosäuren von Proteinen oder in der Sequenz innenliegenden Aminosäuren, werden Proteasen außerdem in die Gruppen der Exo- und Endopeptidasen eingeteilt. Bei den in Tabelle 1 aufgeführten Beispielen handelt es sich ausschließlich um Endopeptidasen. Die Gruppe der Exopeptidasen [21] umfasst unter anderem α -Amino-peptidasen (setzen Aminosäuren vom N-Terminus frei) und Carboxypeptidasen (setzen Aminosäuren vom C-Terminus frei).

In einer 1967 veröffentlichten Publikation über die Charakterisierung des aktiven Zentrums der aus der Papaya gewonnenen Protease Papain, wurde die Sequenz N-terminal von einer Spaltstelle als *non-prime* (Symbol: P_n) und die Sequenz C-terminal von einer Spaltstelle als *prime* Sequenz (Symbol: P_n') bezeichnet (Abb. 2) [22]. Entsprechend wurden die dazugehörigen Substratbindestellen der Protease als S_n bzw. S_n' definiert. Diese nach den Autoren Schechter und Berger benannte Nomenklatur ist bis heute anerkannt und wird auch in dieser Arbeit verwendet.

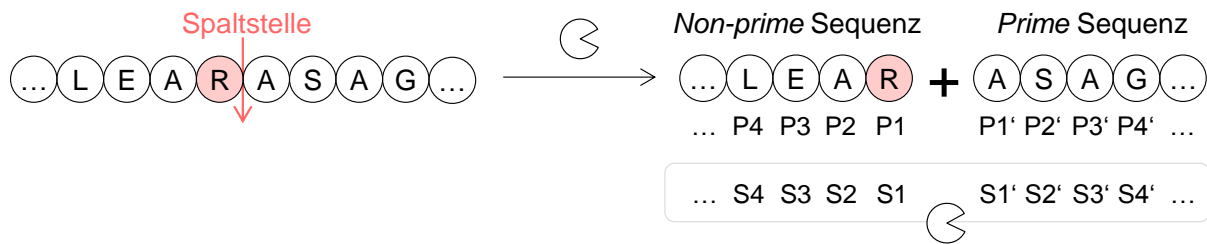


Abb. 2: Nomenklatur der Spaltsequenzen nach Schechter und Berger. Die Sequenz N-terminal von der Spaltstelle wird als non-prime, die Sequenz C-terminal von der Spaltstelle als prime Sequenz bezeichnet.

Abschließend ist zu erwähnen, dass manche Proteasen neben ihrer hydrolytischen Aktivität unter bestimmten Bedingungen auch als Ligasen fungieren und somit neue Peptidbindungen schaffen können. An dieser Stelle ist beispielhaft Carboxypeptidase Y zu nennen. Die Ligase-Aktivität dieser Exopeptidase wurde bereits für analytische Zwecke genutzt (S. 20).

3.3 Proteolytische Netzwerke

Proteolytische Vorgänge *in vivo* sind als irreversible posttranslationale Modifikationen Teil eines komplexen dynamischen Zusammenspiels verschiedener Interaktionspartner (Abb. 3). Dazu zählen unter anderem die Proteasen selbst, ihre Substrate, die aus der Proteolyse resultierenden Spaltprodukte, sowie Aktivatoren oder Inhibitoren der Enzyme. Dabei sind einzelne proteolytische Systeme aber nicht als isoliert, sondern als eng miteinander verflochten, anzusehen. Diese gegenseitige Abhängigkeit wird durch den Begriff *Protease Web* oder proteolytische Netzwerke definiert [23,24].

Um das Ausmaß der Komplexität proteolytischer Vorgänge *in vivo* zu veranschaulichen, werden verschiedene Aspekte im Folgenden anhand der Transmembranprotease ADAM10 beleuchtet.

Im Allgemeinen werden Proteasen zunächst als inaktive Vorstufen, sogenannte Zymogene, translatiert [25]. Durch diesen Mechanismus kann die proteolytische Aktivität sowohl zeitlich als auch räumlich reguliert werden. Die Aktivierung einer Protease erfordert meist die Hydrolyse eines N-terminalen Propeptides, welches das aktive Zentrum der Protease blockiert. Außerdem kann die Bindung eines Kofaktors nötig sein. Im Fall von ADAM10 wird die Prodomäne durch die Proteasen Furin bzw. PC7 von der katalytischen Domäne abgespalten [26]. Jedoch wirkt die Prodomäne durch die Ausbildung eines nicht-kovalenten Enzym-Propeptid-Komplexes weiterhin inhi-

bierend auf die Aktivität der Metalloprotease. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine zweite Hydrolyse innerhalb der Prodomäne durch die Protease Meprin- β zu einer vollständigen Aktivierung von ADAM10 führt [27].

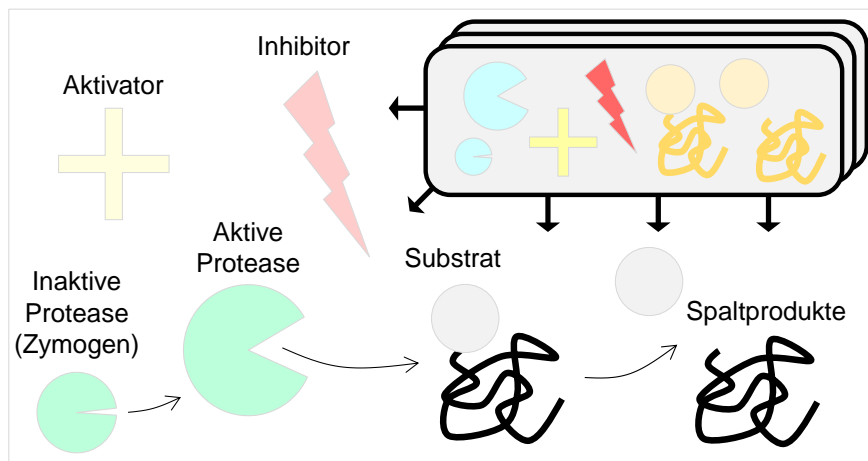


Abb. 3: Zentrale Interaktionspartner proteolytischer Netzwerke: Inaktive Vorstufe der Protease (Zymogen), die aktive Protease, Aktivatoren, Inhibitoren, Substrate und aus der Proteolyse resultierende Spaltprodukte. Proteolytische Signalwege sind nicht als isoliert, sondern als eng miteinander verflochten anzusehen.

Hinsichtlich der Substratspezifität sind Proteasen breit gefächert [28]. Während manche die Hydrolyse nur einer bestimmten Peptidbindung eines Substrates katalysieren, sind andere weitestgehend unspezifisch, wie z. B. Pepsin und Trypsin als Proteasen des menschlichen Verdauungstraktes. Für ADAM10 konnten bisher weit mehr als zwanzig Substrate identifiziert werden [29]. Es ist wichtig klarzustellen, dass die Substratspezifität nicht mit der Spaltspezifität einer Protease gleichzusetzen ist. Bei dieser handelt es sich um die bevorzugte Aminosäuresequenz um eine Spaltstelle. Beispielsweise hydrolysiert Trypsin Peptidbindungen C-terminal von den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, jedoch mit geringerer Affinität wenn darauf ein Prolin folgt [30]. Damit ist Trypsin als eine Protease mit niedriger Substratspezifität, aber hoher Spaltspezifität einzuordnen. Im Gegensatz dazu, zeichnen sich ADAM10, ADAM17 (Kapitel 5) und auch Pepsin (Kapitel 6) durch ein relativ breites Spezifitätsprofil hinsichtlich der *non-prime* und *prime* Sequenz einer Spaltstelle aus.

Generell können sich verschiedene Proteasen ein und dasselbe Substrat teilen. Beispielsweise wird das mit der Alzheimer-Krankheit in Verbindung stehende Transmembranprotein APP (*Amyloid Precursor Protein*) im nicht-amyloidogenen Mechanismus im extrazellulären Bereich von einer α -Sekretase, z. B. ADAM10, und im

alternativen amyloidogenen Reaktionsweg von BACE1, der sogenannten β -Sekretase, hydrolysiert [31,32]. Das daraus jeweils resultierende membranständige C-terminale Fragment wird im nächsten Schritt von der γ -Sekretase, einem Multiprotein-Komplex mit proteolytischen Untereinheiten, innerhalb der Transmembrandomäne geschnitten. Im amyloidogenen Mechanismus entsteht dabei das neurotoxische plaquebildende A β -Peptid. Dies zeigt exemplarisch, dass Spaltprodukte einer proteolytischen Reaktion, als Substrate einer weiteren Protease fungieren können. Gleichzeitig veranschaulicht dieses Beispiel, dass durch unterschiedlich positionierte Spaltstellen in einem Substrat, Spaltprodukte verschiedener biologischer Funktionen entstehen können.

Da der durch die α -Sekretase eingeleitete Reaktionsweg das Entstehen von amyloiden Plaques verhindert, ist es von therapeutischem Interesse diesen Mechanismus zu verstärken. Neben einer Aktivierung von ADAM10 durch die Protease Meprin- β , wurde gezeigt, dass das Protein Tetraspanin15 die aktive Form von ADAM10 stabilisieren und zu einer erhöhten Hydrolyserate von APP führen kann [33]. Aus der erwünschten Aktivierung von ADAM10 im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen, folgt im Gegenzug die unerwünschte Inhibierung. Natürliche Inhibitoren der Metalloprotease sind die Proteine TIMP1 und TIMP3 (TIMP, *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*) [34].

Das Beispiel von der Protease ADAM10, dem Substrat APP, den aus der Proteolyse resultierenden Spaltprodukten, den natürlichen Aktivatoren und Inhibitoren veranschaulicht das komplexe Zusammenspiel verschiedener Interaktionspartner und deren Einbindung in ein proteolytisches Netzwerk.

3.4 Fragestellungen rund um proteolytische Reaktionen

Ausgehend von einer identifizierten Protease stellt sich zunächst die Frage nach den zugehörigen biologischen Substraten. Ebenso erfordert die Feststellung eines proteolytisch prozessierten Proteins die Zuordnung der *in vivo* dafür verantwortlichen Protease. Proteasen werden, wie bereits im vorhergehenden Kapitel erwähnt, unter anderem anhand ihrer Spaltspezifität charakterisiert. Spaltspezifitätsprofile von Proteasen, die beispielsweise über die MEROPS Datenbank [35] verfügbar sind, können bei bekannter Spaltstelle hilfreich sein, um die Anzahl möglicher Kandidaten der für die Hydrolyse verantwortlichen Protease einzuschränken. Umgekehrt kann die bekannte Spaltspezifi-

tät einer Protease die Bestimmung der exakten Position der Spaltstelle innerhalb eines Substrates erleichtern. Die Lokalisierung der Spaltstelle innerhalb der Aminosäuresequenz eines Substrates beinhaltet die simultane Identifizierung der N- bzw. C-Termini generierter Spaltprodukte.

Zeitabhängige Untersuchungen proteolytischer Reaktionen können, neben der Ermittlung von kinetischen Parametern (z. B. v_{\max} , k_{cat} oder K_m), dazu beitragen bevorzugte Substrate, intermediär auftretende Spaltprodukte oder präferierte Spaltstellen zu identifizieren. Zu einem möglichst umfassenden Verständnis proteolytischer Vorgänge gehören außerdem die Identifizierung von Aktivatoren und Inhibitoren sowie die Aufklärung der damit verbundenen regulatorischen Mechanismen, welche weitere posttranslationale Modifikationen (PTMs) beinhalten können. Kürzlich konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Serin-Phosphorylierung von ADAM17 durch die Kinase PLK2 zu einer erhöhten Aktivität der Protease führt [36]. Die gegenseitige Regulation verschiedener posttranslationaler Modifikationen wird als sogenannter *PTM Cross Talk* bezeichnet [37]. Auch strukturelle Aspekte der beteiligten Interaktionspartner sollten nicht vernachlässigt werden. Beispielsweise konnte nachgewiesen werden, dass die Transmembranprotease ADAM17 durch das Enzym Proteindisulfid-Isomerase von einer aktiven in eine inaktive Form überführt wird [38]. Durch die Konformationsänderung ist das aktive Zentrum der Protease für Substrate nicht mehr zugänglich. Zusammenfassend spiegeln die vielfältigen Fragestellungen die hohe Komplexität proteolytischer Vorgänge wider.

3.5 Analytik proteolytischer Reaktionen

3.5.1 Biochemische, zellbiologische Methoden und Tiermodelle

An dieser Stelle wird lediglich ein kurzer Einblick in die Möglichkeiten biochemischer und zellbiologischer Methoden, sowie angewandter Tiermodelle zur Analyse proteolytischer Vorgänge gewährt, da der Fokus der vorliegenden Dissertation auf Strategien unter Zuhilfenahme der Massenspektrometrie liegt.

Ausgehend von einer bisher uncharakterisierten Protease, kann zunächst ein Spaltspezifitätsprofil generiert werden, um mögliche Konsensussequenzen für die Hydrolyse einer Peptidbindung zu identifizieren. Dazu dienen unter anderem Methoden wie der Substrat-Phagen-Display [39,40] und Verfahren unter Anwendung von Peptid-Zufalls-

bibliotheken (*Random Peptide Libraries*) oder sogenannten PS-SCL (*Positional-Scanning Synthetic Combinatorial Libraries*) [41–43]. Die meist fluoreszenzmarkierten Peptidbibliotheken werden dabei entweder in Lösung oder fixiert auf einem Träger, wie auf einem *Microarray*, mit der zu untersuchenden Protease inkubiert [44]. Jedoch sind Spaltspezifitätsprofile der Primärsequenz nicht in jedem Fall dazu geeignet einer Protease potentielle Substrate zuzuordnen, da bei der Substraterkennung oftmals Wechselwirkungen höherer Ordnung, beispielsweise zwischen verschiedenen Domänen, eine Rolle spielen. In diesem Fall kann unter anderem das Hefe-Zwei-Hybrid-System (*Yeast-Two-Hybrid Screen*) zur Identifizierung von möglichen Interaktionspartnern der Protease herangezogen werden [45]. Wurden mehrere Proteine als mögliche Substrate einer bestimmten Protease identifiziert, können proteolytische Vorgänge inklusive der Hydrolyserate nachfolgend mittels SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), Western Blot oder Zymographie [46,47] untersucht werden.

Im Gegensatz zu biochemischen *in vitro* Methoden berücksichtigen zellbiologische Verfahren sowie Tiermodelle verschiedene zelluläre Kompartimentierungen von Protease und Substrat, sowie posttranslationale Regulationsmechanismen. Eine Methode zur Bestimmung der Aktivität einer Protease, die sowohl *in vitro*, *in cellulo* als auch *in vivo* breite Anwendung findet, ist das sogenannte *Activity-based Profiling* [48]. *Substrate-based Probes* dienen hierbei zur Ermittlung der Hydrolyserate eines synthetisch hergestellten Substrates, welches selektiv von der zu untersuchenden Protease gespalten wird. Das Substrat wird in den meisten Fällen nach dem FRET (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer) Prinzip N- und C-terminal jeweils mit einem Fluorophor und einem Quencher versehen. Erst nach Hydrolyse des Substrates entsteht Fluoreszenz, welche durch Fluorimeter, Plattenleser, Fluoreszenz-Mikroskope oder mittels *in vivo* Bildgebungsverfahren detektiert werden kann. Das Prinzip von *Activity-based Probes* beruht hingegen auf der kovalenten Bindung eines synthetischen Substrates in das aktive Zentrum der Protease. Das spezifische Substrat ist hierbei entweder fluoreszenz- oder affinitätsmarkiert. Diese Strategie kann unter anderem die Suche nach einer bis dato unbekanntem Protease zu einem bekannten Spaltprodukt erleichtern oder zur Lokalisierung einer Protease im zellulären Kontext beitragen.

In der Zellkultur werden im Allgemeinen hauptsächlich *Loss-of-Function* Systeme, welche aus Knockout-Tiermodellen isoliert wurden, mit Wildtyp-Zellen verglichen. Demgegenüber stehen *Gain-of-Function* Kulturen, welche Kenntnisse über Aktivierungs-

bzw. Inhibierungsmechanismen des betrachteten proteolytischen Systems voraussetzen. Tiermodelle, meist werden genetisch modifizierte Mäuse verwendet, erlauben die physiologische bzw. pathologische Bedeutung eines identifizierten Protease-Substrat-Paares im Kontext eines vollständigen Organismus einzuordnen. Unter anderem können Protease-Knockout, Substrat-Knockout oder sogenannte transgene Mausmodelle generiert werden [20].

3.5.2 Methoden unter Zuhilfenahme der Massenspektrometrie

Proteomik, Degradomik und Massenspektrometrie

Der Begriff „Proteom“ wurde erstmals 1994 auf einer Konferenz im italienischen Siena verwendet [49]. Er bezeichnet die Gesamtheit aller Proteine, die zu einem gegebenen Zeitpunkt in einer Zelle oder einem Gewebe vorliegen. Während das Genom von eher statischer Natur ist, ist das Proteom durch eine hohe Dynamik und Komplexität gekennzeichnet, die durch verschiedene Protein-Isoformen, verursacht unter anderem durch alternatives Spleißen und posttranslationale Modifikationen, zustande kommt [50]. Die analytische, sich mit dem Proteom in verschiedensten Fragestellungen befassende Forschungsrichtung wird als Proteomik (*Proteomics*) bezeichnet. Entsprechend wird das um das Genom konzentrierte analytische Forschungsgebiet als Genomik (*Genomics*) definiert.

In der Proteaseforschung umfasst der Begriff „Degradomik“ (*Degradomics*) sowohl genomische als auch proteomische Strategien zur Analyse proteolytischer Vorgänge, inklusive der Identifizierung aller beteiligten Interaktionspartner, in einem Organismus [51]. Die Gesamtheit aller Proteasen, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in einem Gewebe oder einem Organismus vorliegen, wird als Degradom (*Degradome*) bezeichnet. Das Substratdegradom (*Substrate Degradome*) steht hingegen für das Substratsortiment einer einzelnen Protease. Die N- oder C-terminale Degradomik befasst sich mit der Identifizierung proteolytisch generierter N- bzw. C-Termini.

Als zentrale, in den letzten Jahrzehnten stetig verbesserte Technologie ist die Massenspektrometrie in der qualitativen und quantitativen Proteomik/Degradomik nicht mehr wegzudenken. Die hohe Sensitivität und Selektivität ermöglicht die Ergebnisse biochemischer Methoden, wie die des klassischen Western Blots, zu validieren [52]. Ein erster großer Durchbruch in den späten 1980er Jahren war die Entwicklung sanfter Ionisierungsmethoden, wie MALDI (Matrix-gestützte Laser-

desorptions-Ionisierung, *Matrix-assisted Laser Desorption Ionization*) [53,54] oder ESI (Elektrospray-Ionisierung, *Electrospray Ionization*) [55], zur Analyse großer Biomoleküle. Die Markteinführung des Orbitrap Massenanalysators [56,57] im Jahr 2005 revolutionierte die massenspektrometrische Proteinanalytik von Neuem. Die weit verbreiteten ESI LTQ Orbitrap Massenspektrometer zeichnen sich unter anderem durch eine hohe Auflösung und Massengenauigkeit aus. Neben CID (*Collision-induced Dissociation*) und HCD (*Higher Energy Collisional Dissociation*), sind die Geräte optional mit alternativen Fragmentierungstechniken wie ETD (*Electron Transfer Dissociation*) [58,59] ausgestattet, die beispielsweise die Analyse posttranslationaler Modifikationen erleichtern. Die *Online*-Kopplung von LC-Systemen mit ESI Massenspektrometern ermöglicht die simultane Trennung und MS Analyse komplexer Proben.

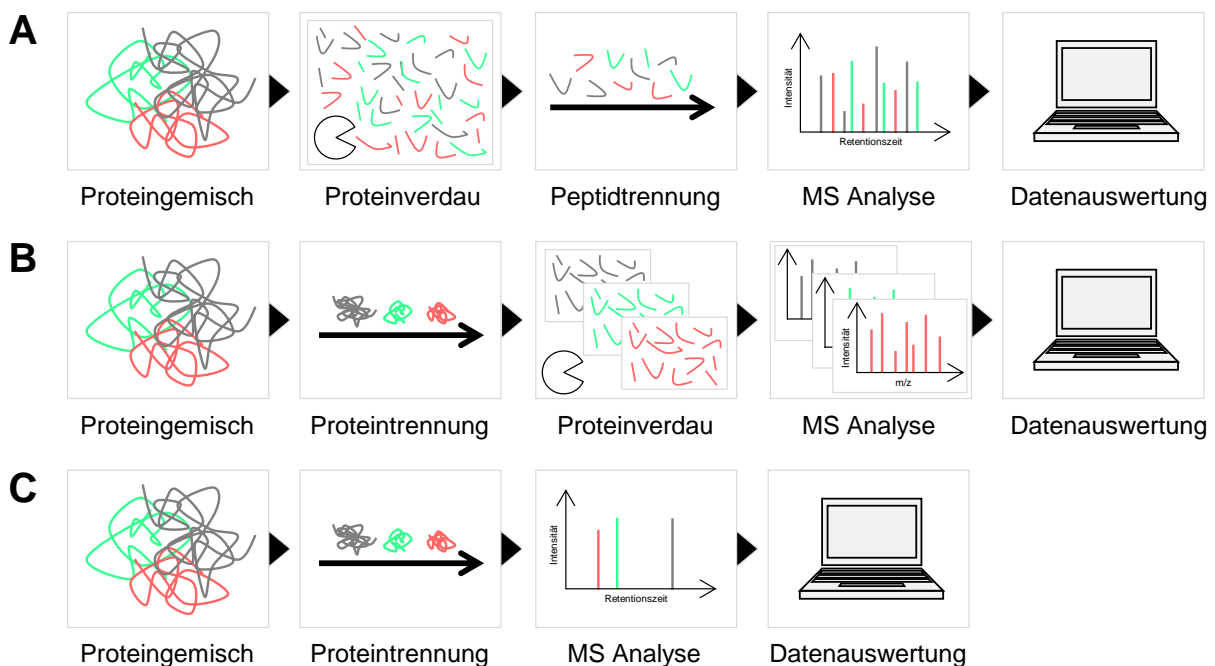


Abb. 4: Proteomische Bottom-up und Top-down Strategien. In einer Bottom-up Strategie (A) werden die Proteine bereits vor der Trennung mit einer Protease verdaut. Auch die MS Analyse findet auf der Ebene von Peptiden statt. Werden Analyten auf der Ebene von Proteinen getrennt, anschließend verdaut und auf der Ebene von Peptiden massenspektrometrisch untersucht, so handelt es sich um eine Kombination aus Top-down und Bottom-up Strategie (B). In einer Top-down Strategie (C) finden Probentrennung und MS Analyse auf der Ebene von Proteinen statt. Es wird keine Protease eingesetzt.

Grundsätzlich werden in der Proteomik im Hinblick auf die Trennung der Analyten und die MS Analyse *Bottom-up* von *Top-down* Strategien [60] unterschieden (Abb. 4). Während die Trennung der Analyten sowie die MS Analyse in der *Top-down* Proteomik (Abb. 4C) auf der Ebene intakter Proteine erfolgt, werden die Proteine in der *Bottom-up*

Proteomik vor der Probentrennung und der MS Messung durch eine Protease, wie Trypsin, zu Peptiden hydrolysiert (Abb. 4A). Bei der sogenannten *Shotgun* Methode handelt es sich um einen solchen *Bottom-up* Ansatz. Dabei werden Proteine zuerst verdaut, das komplexe Peptidgemisch danach chromatographisch aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert (z. B. MudPIT, *Multidimensional Protein Identification Technology* [61]). Werden die Analyten zunächst auf der Ebene von Proteinen getrennt, beispielsweise mittels 2D-GE (Zweidimensionale Gelelektrophorese) [62,63], und die anschließend idealerweise einzeln vorliegenden Proteine zur nachfolgenden MS Analyse mit einer Protease verdaut, so handelt es sich um eine Kombination aus *Top-down* und *Bottom-up* Strategie (Abb. 4B). Die jeweils mit *Bottom-up* bzw. *Top-down* Strategien verbundenen Vor- und Nachteile werden in Kapitel 7.1.2 diskutiert.

Nachfolgend werden in diesem Kapitel weit verbreitete proteomische Strategien zur Analyse proteolytischer Vorgänge beschrieben, wobei es sich mit Ausnahme der 2D-DIGE (Zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese) [64] ausschließlich um *Bottom-up* Methoden handelt. Sie dienen der Bestimmung von Spaltspezifitäten oder der Identifizierung von Substratkandidaten durch die Analyse proteasegenerierter N- bzw. C-Termini oder durch den Einsatz der 2D-DIGE. Die zu testende Protease (*Target* Protease) kann dabei entweder auf Peptid- oder Proteinebene angewendet werden, wobei im letzten Fall anschließend eine zweite unabhängige Protease (*Work* Protease) eingesetzt wird, um Peptide für die MS Analyse zu erzeugen. Eine Reihe von Übersichtsartikeln bieten Einblick in die Vielfalt der verfügbaren MS Methoden zur Analyse proteasekatalysierter Reaktionen [65–68].

Bestimmung der Spaltspezifität einer Protease mittels Peptidbibliotheken

Die sogenannte PICS (*Proteomic Identification of Protease Cleavage Sites*) Methode [69] dient der Ermittlung bevorzugter Spaltsequenzen einer Protease unter Verwendung proteombasierter Peptidbibliotheken. Zur Herstellung entsprechender Peptidbibliotheken wird ein natürliches Proteom zunächst mit einer *Work* Protease, wie Trypsin, verdaut. Nach deren Inaktivierung werden Disulfidbrücken reduziert und freie Cystein-Reste alkyliert. Primäre Amine der Peptid-N-Termini und Lysin-Reste werden durch reduktive Dimethylierung blockiert und die Peptidbibliotheken anschließend aufgereinigt. Nun wird die *Target* Protease unter definierten Reaktionsbedingungen mit der Peptidbibliothek inkubiert. Durch die Hydrolyse von Peptidbindungen entstehen neue

N-Termini mit freien primären Aminen, die im nachfolgenden Schritt biotinyliert und mithilfe von Streptavidin angereichert werden. *Prime* Sequenzen der Spaltstellen werden folglich mittels LC-MS, *non-prime* Sequenzen bioinformatisch ermittelt. Die Zusammenfassung der einzelnen identifizierten Spaltsequenzen ergibt letztendlich ein bevorzugtes Sequenzmotiv der untersuchten Protease.

Mithilfe von PICS wurden unter anderem die Proteasen MMP-2 (Matrix-Metalloprotease 2), Thrombin, Elastase, Cathepsin G und K, HIV Protease 1, Caspase 3 und 7 [69], Meprin- α und Meprin- β [70] sowie Cathepsin B, L und S [71] und kürzlich die Schlangengiftproteasen Bothrops Protease A und PA-BJ [72] sowie MMP-ähnliche Proteine aus der Pflanze *Arabidopsis thaliana* [73] erfolgreich charakterisiert.

Eine aus PICS hervorgegangene Methode, der sogenannte Q-PICS (*Quantitative Proteomic Identification of Protease Cleavage Sites*) Ansatz [74], erlaubt die simultane relative Quantifizierung proteolytischer Vorgänge und damit unter anderem den Vergleich zwischen verschiedenen Reaktionsbedingungen. Die Spaltspezifität der Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 wurde mithilfe eines optimierten Protokolls von Q-PICS ermittelt (Kapitel 5).

N-Terminale Degradomik

Mögliche Substratkandidaten einer Protease werden größtenteils über die Analyse N-terminaler Proteinsequenzen identifiziert. Außerdem können auf diese Weise Unterschiede proteolytischer Muster bei verschiedenen Reaktionsbedingungen beobachtet werden. Zu diesem Zweck wurden zahlreiche auf enzymatischer oder chemischer Derivatisierung des N-Terminus basierende Methoden entwickelt. Während chemische Derivatisierungen oft von unerwünschten Nebenreaktionen begleitet werden, sind enzymatisch katalysierte durch eine hohe Selektivität gekennzeichnet. Dies ermöglicht die selektive Umsetzung der primären α -Amine und nicht der ϵ -Amine.

Eine auf enzymatischer Derivatisierung basierende Methode nutzt die Ligase Subtiligase um Protein-N-Termini mit einem biotinylierten Peptidglykolester zu verknüpfen [75]. Anschließend werden die Proteine mit Trypsin verdaut und biotinylierte N-Termini durch immobilisiertes Avidin angereichert, wobei von sogenannter positiver Anreicherung gesprochen wird. Bei einer negativen Anreicherungsmethode werden hingegen die überflüssigen Analyten aus der Probe gefiltert, während die relevanten in Lösung verbleiben. Durch eine spezifische TEV Protease Spaltstelle im biotinylierten

Peptidglykolester werden die angereicherten N-Termini freigesetzt und mittels LC-MS analysiert. Anhand dieser Methode wurden beispielsweise proteolytische Vorgänge von Caspasen in Zelllysaten apoptotischer Jurkat Zellen untersucht [75].

Mithilfe der N-terminalen COFRADIC (*Combined Fractional Diagonal Chromatography*) Methode [76–78] wurden unter anderem die Proteasen Granzym A [79] und B [80] hinsichtlich ihrer Substratspezifität charakterisiert. Meist wird hierbei SILAC (*Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture*) [81] verwendet, um proteasegenerierte von originalen bzw. durch andere Proteasen entstandene N-Termini zu unterscheiden. Nach Inkubation eines Zelllysates mit der *Target* Protease werden zunächst Disulfidbrücken reduziert und Thiolgruppen der Proteine alkyliert bevor freie primäre α - und ε -Amine trideuteroacetyliert werden. Durch die Markierung mit stabilen Isotopen können anschließend natürlich acetylierte von *in vivo* freien N-Termini unterschieden werden. Nach tryptischem Verdau werden interne Peptide, welche durch ein C-terminales Arginin gekennzeichnet sind, durch eine Kationenaustausch-Kartusche bei pH 3 adsorbiert. Der die N-terminalen und C-terminalen Peptide enthaltende Durchfluss wird anschließend mittels RP-HPLC (primäre Trennung) fraktioniert und die einzelnen Fraktionen mit TNBS (2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure) umgesetzt, wodurch ausschließlich freie primäre Amine modifiziert werden. Nach erneuter RP-HPLC (sekundäre Trennung) bei selbem Gradienten eluieren die derivatisierten Peptide aufgrund ihrer erhöhten Hydrophobizität später als bei der ersten chromatographischen Trennung. Hingegen sind die interessierenden und durch TNBS nicht modifizierten Protein-N-Termini bei gleicher Retentionszeit detektierbar und werden ein weiteres Mal für die anschließende LC-MS Analyse fraktioniert. Das allgemeine COFRADIC-Prinzip der Veränderung der Retentionszeit, in Folge chemischer oder enzymatischer Umsetzung der relevanten bzw. irrelevanten Peptide, wurde bis heute auf verschiedenste PTMs, wie Phosphorylierungen [82], N-Glykosylierungen [83] oder auch Ubiquitinierungen [84] ausgeweitet.

Kürzlich wurde eine auf ähnlichem Prinzip basierende Methode zur Analyse N-terminaler Proteinsequenzen veröffentlicht: ChaFRADIC (*Charge-based Fractional Diagonal Chromatography*) [85]. Neben unterschiedlichen Derivatisierungsreagenzien wird Kationenaustausch- anstatt Umkehrphasenchromatographie zur primären und sekundären Trennung verwendet.

Die N-CLAP (*N-Terminalomics by Chemical Labeling of the α -Amine of Proteins*) Methode [86] dient ebenfalls der Analyse N-terminaler Proteinsequenzen. Hierbei werden zunächst alle primären Amine mit Phenylisothiocyanat, dem zentralen Reagenz des Edman-Abbaus [87], modifiziert. Durch eine nachfolgende Ansäuerung mit TFA wird nach dem Edman-Reaktionsmechanismus die Peptidbindung zwischen der ersten und zweiten N-terminalen Aminosäure des Proteins gespalten. Der nun freie N-Terminus wird mithilfe eines N-Hydroxysulfosuccinimidesters (Sulfo-NHS-SS-Biotin) biotinyliert, wobei die N-Hydroxysulfosuccinimidesterfunktion über eine Thioetherbrücke mit Biotin verbunden ist. Anschließend werden die Proteine mit einer Protease verdaut und die N-terminalen Peptide durch Avidin angereichert. Durch Reduktion des Thioethers werden die N-Termini schließlich freigesetzt und mittels LC-MS analysiert. Die Autoren verglichen proteolytische Muster von unbehandelten und mit Cisplatin behandelten Jurkat Zellen. In den mit dem Chemotherapeutikum behandelten Zellen konnte aufgrund der induzierten Apoptose eine erhöhte Anzahl von Caspase-Spaltstellen nachgewiesen werden.

Eine weitere Methode, TAILS (*Terminal Amine Isotopic Labeling of Substrates*) [88], ermöglicht die simultane Unterscheidung nativer bzw. durch andere Proteasen entstandener N-Termini von proteolytischen Vorgängen der *Target* Protease durch Stabilisotopenmarkierung (Abb. 5). Ein Aliquot eines Zelllysats dient dabei als Kontrolle, während ein zweites mit der entsprechenden Protease inkubiert wird. Nach Reduktion und Alkylierung von Cystein-Resten werden primäre α - und ϵ -Amine durch reduktive Dimethylierung blockiert, wobei herkömmliches oder stabilisotopenmarkiertes Formaldehyd verwendet wird. Anschließend werden die Proben vereinigt, die Proteine tryptisch verdaut und interne sowie C-terminale Peptide, die freie primäre Amine enthalten, durch ein Aldehydpolymer aus der Lösung entfernt. Entfällt dieser Schritt der negativen Anreicherung, so wird nicht von TAILS, sondern von ATOMS (*Amino-terminal Oriented Mass Spectrometry of Substrates*) [89] gesprochen. Bei der abschließenden LC-MS Analyse sind in Kontrolle und Experiment gleichermaßen enthaltene N-Termini im Massenspektrum als Doppelsignale zu erkennen, während sich die von der *Target* Protease generierten N-Termini durch einzelne Signale auszeichnen.

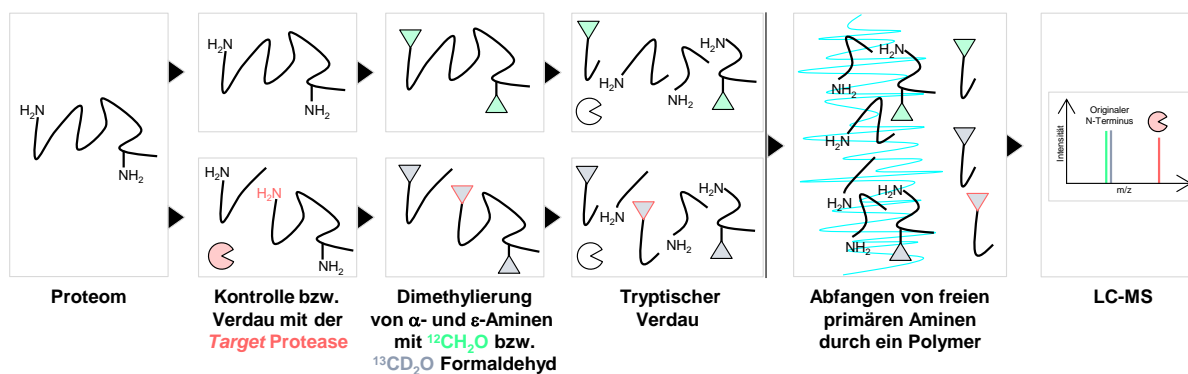


Abb. 5: Die TAILS Methode mit Kontrolle (oben) und Protease-Experiment (unten). Nach Inkubation des Proteoms mit der Target Protease werden Disulfidbrücken reduziert und freie Thiolgruppen alkyliert (nicht dargestellt).

Eine Weiterentwicklung, die iTRAQ-TAILS Methode [90], nutzt anstelle der Dimethylierung die Derivatisierung von primären Aminen mit isobaren iTRAQ-Reagenzien [91] auf Proteinebene. Diese Strategie verringert zum einen die Probenkomplexität, da die Quantifizierung auf der Ebene von MS2-Spektren erfolgt, und ermöglicht zum anderen den quantitativen Vergleich von bis zu vier oder acht Proben. Das Substratdegradom von MMP-2 und MMP-9 wurde beispielsweise mithilfe von iTRAQ-4plex analysiert [90].

C-Terminale Degradomik

Durch die proteasekatalysierte Hydrolyse einer Peptidbindung entsteht neben einem N-Terminus ein neuer C-Terminus. Während für die Analyse N-terminaler Proteinsequenzen ein breites Methodenspektrum zur Verfügung steht, ist die Auswahl für die Analyse C-terminaler Sequenzen eher begrenzt. Dies ist unter anderem auf die vergleichsweise geringe chemische Reaktivität von Carboxylgruppen zurückzuführen. Allgemein bekannte Strategien zur Erhöhung der Reaktivität einer Carbonsäurefunktion, wie beispielsweise die Veresterung mit einem Alkohol oder die Umsetzung mit einem Carbonsäurechlorid zu einem hoch reaktiven Carbonsäureanhydrid, sind meist mit extremen, nicht biokompatiblen Reaktionsbedingungen verbunden. Außerdem mangelt es den vorgeschlagenen Reaktionsmechanismen in der Regel an Selektivität; zum einen im Hinblick auf Nebenreaktionen der verwendeten Reagenzien mit anderen funktionellen Gruppen als der Carboxylfunktion und zum anderen bezogen auf die im Vergleich zum C-Terminus hoch abundanten Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure, welche ebenfalls Carboxylfunktionen enthalten. Hinzu kommt, dass die massenspektrometrische Identifizierung von C-terminalen Peptiden oft eine Herausforderung darstellt,

da diese in einem tryptischen Verdau in den meisten Fällen nur das primäre Amin des N-Terminus als basische funktionelle Gruppe besitzen. Im Vergleich dazu enthalten N-terminale bzw. interne Peptide tryptischer Natur zusätzlich eine C-terminale basische Aminosäure (Lysin oder Arginin), welche die Ionisierung dieser Peptide fördert.

Bei ProC-TEL (*Protein C-Termini by Enzymatic Labeling*) [92] handelt es sich um eine Methode, die sich die Ligase-Aktivität der Exopeptidase Carboxypeptidase Y bei hohen pH-Werten zunutze macht. Zunächst werden die Carboxylfunktionen der Asparaginsäure- und Glutaminsäure-Reste sowie der Protein-C-Termini im Sauren methylverestert, was zu einer Erhöhung der Reaktivität führt. Anschließend werden die C-Termini bei einem pH-Wert von 11,6 durch Carboxypeptidase Y selektiv mit einem biotinylierten Lysinderivat (Biocytinamid) modifiziert. Nach tryptischem Verdau werden C-terminale Peptide durch Avidin angereichert und mittels LC-MS analysiert. Um den quantitativen Vergleich verschiedener Proben zu ermöglichen, schlagen die Autoren die Verwendung eines stabilisotopenmarkierten Biocytinamid-Derivates vor.

Das bereits beschriebene N-terminale COFRADIC Protokoll kann durch eine kleine Modifizierung auch zur Analyse C-terminaler Proteinsequenzen verwendet werden [93]. Der Durchfluss von der Kationenaustausch-Kartusche enthält sowohl N- als auch C-terminale Proteinsequenzen. Nach der primären Trennung/Fraktionierung der Probe werden die freien primären α -Amine der C-terminalen Peptide mithilfe von NHS-Estern (NHS, N-Hydroxysuccinimid) von $^{12}\text{C}_4$ - bzw. $^{13}\text{C}_4$ -Buttersäure derivatisiert. Durch die Erhöhung der Hydrophobizität erfahren sie bei der sekundären Trennung eine Änderung der Retentionszeit und können so anschließend mittels LC-MS als C-terminale Proteinsequenzen identifiziert werden.

Im C-TAILS (*C-Terminal Amine-based Isotope Labeling of Substrates*) Protokoll [94] werden die in der Kontrolle und die in dem mit der *Target* Protease inkubierten Zellysat enthaltenen Proteine zunächst reduziert und Thiolgruppen alkyliert. Anschließend werden primäre Amine durch reduktive Dimethylierung mit herkömmlichem bzw. stabilisotopenmarkiertem Formaldehyd blockiert; Carboxylfunktionen (C-Termini, Asparaginsäure- und Glutaminsäure-Reste) werden mit Ethanolamin modifiziert. Nach tryptischem Verdau werden freie primäre α -Amine erneut mit herkömmlichem bzw. stabilisotopenmarkiertem Formaldehyd dimethyliert, während die entstandenen Carboxylgruppen frei bleiben und nach Vereinigung von

Kontrolle und Experiment kovalent an ein Polymer gebunden werden. Die relevanten Protein-C-Termini befinden sich in Lösung und werden mittels LC-MS analysiert.

Zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese

Die zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese (2D-DIGE) [64,95] basiert, im Gegensatz zu den oben beschriebenen *Bottom-up* Methoden, auf einer Kombination von *Top-down* und *Bottom-up* Prinzip (Abb. 4B, S. 14). Intakte Proteine werden mittels 2D-GE [62,63] getrennt: Isoelektrische Fokussierung in der ersten Dimension (Trennung aufgrund des pI-Wertes) und SDS-PAGE in der zweiten Dimension (Trennung aufgrund des Molekulargewichtes). Vor der Elektrophorese werden maximal drei zu vergleichende Proteinproben jeweils mit einem aminspezifischen Fluoreszenzfarbstoff, Cy3, Cy5 oder Cy2, derivatisiert und anschließend zu gleichen Teilen vereinigt. Nach der 2D-GE können zwischen den Proben identische bzw. differierende Proteinspots höchst sensitiv mithilfe eines Fluoreszenz-Gelscanners detektiert und deren Intensität quantitativ erfasst werden. Relevante Proteinspots werden aus dem Gel ausgeschnitten, die Proteine mit Trypsin im Gel verdaut und massenspektrometrisch, meist mittels MALDI MS, identifiziert. Auf diese Weise kann beispielsweise das Proteinprofil von Zellen, in denen eine bestimmte Protease aktiviert oder inhibiert wurde, mit dem unbehandelten Zellen verglichen werden.

4 Zielsetzung der Arbeit

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Projekte wurden durch den Sonderforschungsbereich „*Proteolysis as a Regulatory Event in Pathophysiology*“ (SFB 877) der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. Mithilfe gegenseitiger Unterstützung zielen die einzelnen Forschungsprojekte des SFB 877 darauf ab, proteolytische Vorgänge und deren regulatorische Mechanismen möglichst genau nachzuvollziehen. Pathologisch interessante Proteasen, wie ADAM10 und ADAM17, stehen hierbei im Vordergrund und das gemeinsam gesammelte Wissen soll letztendlich der Entwicklung neuer Krankheitstherapien zugute kommen. Die Aufgabe des Forschungsprojektes Z2 (Prof. Dr. Andreas Tholey) der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel ist hierbei zum einen die Entwicklung von massenspektrometrischen Methoden zur Analyse proteasekatalysierter Reaktionen. Zum anderen sollen diese und bereits etablierte auf der Massenspektrometrie basierende proteomische Strategien auf die vom SFB 877 vorgegebenen Fragestellungen angewendet werden.

Ziel des ersten Projektes der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der Spaltspezifität der Proteasen ADAM10 und ADAM17 (Kooperation mit Forschungsprojekt A9, Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly). Hierfür sollte die vorhergehend im SFB 877 entwickelte Q-PICS Methode [74] verwendet und gegebenenfalls optimiert werden. Außerdem sollte gezeigt werden, ob die simultane Anwendung von zwei komplementären MS Plattformen, MALDI und ESI MS, die Informationsausbeute erhöhen kann.

In einer zweiten Problemstellung sollte eine LC-MS Methode zur zeitaufgelösten Analyse einer proteolytischen Reaktion etabliert werden, wobei der Verdau des Hühnereiweiß-allergens Lysozym durch die Magensaftprotease Pepsin als physiologisch relevantes Beispiel dienen sollte. Außerdem sollte untersucht werden, inwiefern Disulfidbrücken den proteolytischen Verdau als posttranslationale Modifikationen beeinflussen.

Ein letztes Projekt beinhaltet die Identifizierung der Meprin- α/β Spaltstellen im Zytokin Interleukin-6 mittels *Top-down* Massenspektrometrie (Kooperation mit Forschungsprojekt A9). Da die MS Analyse von intakten Proteinen oft eine technologische Herausforderung darstellt, andererseits jedoch viele Vorteile mit sich bringt, sollten im Rahmen dieses Projektes grundlegende Untersuchungen durchgeführt und dokumentiert werden.

5 Bestimmung der Spaltspezifität von ADAM10 und ADAM17

5.1 Einleitung

5.1.1 ADAM10 und ADAM17

ADAM10 und ADAM17 sind die bis heute am umfangreichsten charakterisierten Vertreter der ADAM (*A Disintegrin and Metalloprotease*) Proteasen. Sie werden neben MMPs oder Astazin-Proteasen, wie z. B. Meprin- α und Meprin- β , zur Superfamilie der Metzinkine [96] gezählt. Dabei handelt es sich um zinkabhängige Metalloproteasen, die unter anderem aufgrund der Struktur des drei Histidin-Reste enthaltenden Zinkbindungsmotives im aktiven Zentrum zusammengefasst werden. ADAMs sind glykosylierte Typ-1-Transmembranproteine und kommen vor allem in Wirbeltieren, aber nicht in Bakterien oder Pflanzen vor [97–99]. Homologe der Enzyme wurden beispielsweise auch im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* oder der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* identifiziert.

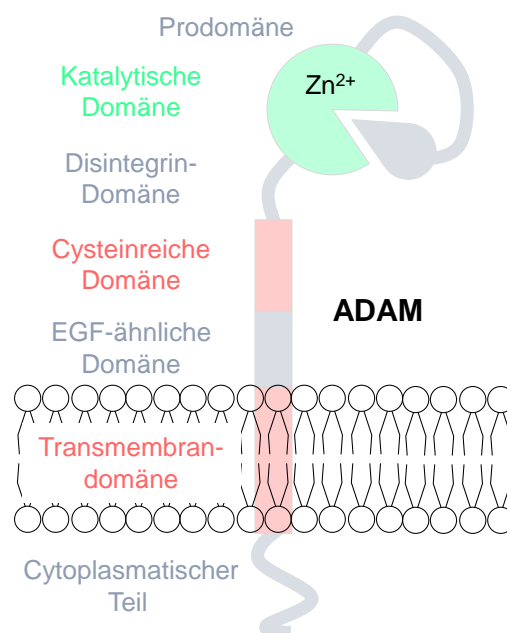


Abb. 6: Aufbau von ADAMs. ADAM10 und ADAM17 besitzen keine EGF-ähnliche Domäne.

An eine N-terminale Prodomäne, die als Chaperon zur korrekten Proteinfaltung beiträgt [100–102] und die Proteaseaktivität als intramolekularer Inhibitor reguliert [103], schließt die katalytische Metalloprotease-Domäne an. Grundsätzlich folgen eine

Disintegrin-Domäne, eine cysteinreiche Domäne, eine EGF-ähnliche Domäne (EGF, *Epidermal Growth Factor*), eine Transmembrandomäne sowie ein C-terminaler cytoplasmatischer Teil [99] (Abb. 6). ADAM10 und ADAM17 bilden insofern eine Ausnahme, da sie keine EGF-ähnliche Domäne besitzen [104].

Die beiden Proteasen prozessieren verschiedene Transmembranproteine (z. B. Zytokine, Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren oder Membranrezeptoren) und übernehmen zentrale Funktionen in diversen physiologischen Prozessen, wie der Signaltransduktion, der Zelladhäsion oder der Proliferation [29]. Die Proteolyse von Transmembranproteinen an der Zelloberfläche wird im Allgemeinen als *Ectodomain Shedding* und die dafür verantwortlichen Proteasen als *Sheddasen* bezeichnet.

Es sind sowohl gemeinsame als auch spezifische Substrate von ADAM10 und ADAM17 bekannt [29]. So werden unter anderem Notch-1 [105,106] oder EGF [107] von beiden Proteasen prozessiert. ADAM10 ist demgegenüber hauptsächlich für die Proteolyse der Adhäsionsmoleküle N-Cadherin [108] oder VE-Cadherin [109,110] verantwortlich. Das proinflammatorische Zytokin TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) [111–113] wird bevorzugt von ADAM17 freigesetzt und die *Sheddase* alternativ als TACE (*Tumor Necrosis Factor α -Converting Enzyme*) bezeichnet.

In Zusammenhang mit neurodegenerativen, entzündlichen Erkrankungen und Krebs wurde in zahlreichen Studien eine Fehlregulation beider Proteasen beobachtet. Während der proteolytischen Aktivität von ADAM10 und ADAM17 bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimer-Krankheit, grundsätzlich eine positive Wirkung zugeschrieben wird, werden die Proteasen bei entzündlichen Prozessen und Krebserkrankungen hauptsächlich mit negativen Effekten in Verbindung gebracht [29]. Aufgrund ihrer pathologischen Bedeutung sind ADAM10 und ADAM17 daher von großem Interesse für die Entwicklung neuer Therapien [114]. Eine Herausforderung stellt die Suche nach selektiven Inhibitoren der Proteasen dar, da beispielsweise das aktive Zentrum von MMPs eine ähnliche Struktur wie das der ADAMs aufweist. Durch Kreuzwechselwirkungen von inhibierenden Substanzen mit verschiedenen Proteasen können Nebenwirkungen mit schweren physiologischen Konsequenzen ausgelöst werden.

Spaltspezifitätsprofile können grundsätzlich hilfreich bei der Entwicklung spezifischer Proteaseinhibitoren sein. Das umfangreiche Wissen um die Spaltspezifität von Proteasen unterstützt außerdem die Lokalisierung von Spaltstellen innerhalb von Aminosäure-

sequenzen neu entdeckter Substrate und erleichtert umgekehrt die Zuordnung verantwortlicher Proteasen zu einem bekannten Spaltprodukt. Die MEROPS Datenbank [35] stellt Spaltspezifitätsprofile verschiedener Proteasen zur Verfügung, die durch die Kombination von publizierten Spaltstellen in physiologischen Substraten sowie in synthetischen Peptiden ermittelt werden. Für ADAM10 werden in dieser Datenbank lediglich 40, für ADAM17 60 Spaltstellen aufgeführt (Stand: 04.05.2015). Frühere Studien befassten sich insbesondere mit der Spaltspezifität von ADAM17. Dabei wurden beispielsweise synthetische Peptide mit *in vivo* identifizierten Spaltsequenzen [115] oder angelehnt an die Spaltstelle in TNF- α zehn fluorogene Peptide mit variierenden P1 und P1' Positionen [116] verwendet. Zudem wurde die P1' bzw. P2' Spaltspezifität von ADAM17 mithilfe einer synthetischen Peptidbibliothek untersucht [117]. In der bis dato umfangreichsten Studie wurde das Spaltspezifitätsprofil von ADAM17 und auch von ADAM10 mithilfe von synthetischen Peptidbibliotheken und Edman-Sequenzierung ermittelt [118]. Hierbei wurde festgestellt, dass ADAM10 bevorzugt Peptidbindungen mit Leucin oder aromatischen Aminosäuren und ADAM17 solche mit Valin an der P1' Position hydrolysiert. Um methodische Nachteile der vorangegangenen Studien, wie kleine Datensätze oder die Verwendung künstlicher Peptidsequenzen, zu umgehen, sollte die Spaltspezifität von ADAM10 und ADAM17 in der vorliegenden Arbeit anhand von proteombasierten Peptidbibliotheken und LC-MS Analysen basierend auf der bereits erwähnten Q-PICS Methode (S. 16) [74] bestimmt werden.

5.1.2 Die Q-PICS Methode

Im Q-PICS Ansatz [74] erlaubt die Derivatisierung von proteasegenerierten N-Termini mit isobaren TMT-6plex-Reagenzien (TMT, *Tandem Mass Tag*) [119] eine simultane Identifizierung und relative Quantifizierung proteolytischer Vorgänge auf der Basis von MS2-Spektren. Auf diese Weise kann beispielsweise der Einfluss verschiedener Reaktionsbedingungen (z. B. pH-Wert, Puffer, Temperatur oder Zusatz eines Inhibitors) auf eine proteasekatalysierte Reaktion untersucht werden. Alternativ können bis zu sechs Replikate einer Reaktion parallel zur Verbesserung der Datenqualität analysiert werden. Im Gegensatz zu PICS (S. 15) [69] beinhaltet Q-PICS keinen Schritt zur Anreicherung von proteasegenerierten N-Termini.

Zur Herstellung einer Peptidbibliothek werden die Proteine eines Proteoms zunächst reduziert und alkyliert und anschließend mithilfe einer *Work* Protease definierter

Spaltspezifität verdaut. Primäre Amine werden dimethyliert und die Bibliotheken aufgereinigt. Nachfolgend werden sechs Replikate der Peptidbibliotheken bei den relevanten Reaktionsbedingungen mit der *Target* Protease inkubiert. Die sechs Proben werden zu gleichen Teilen vereinigt und mittels LC-MS analysiert. Während *prime* Sequenzen massenspektrometrisch erfasst werden, werden *non-prime* Sequenzen bioinformatisch ermittelt. Quantitative Daten werden anhand der TMT-Reporterionenverhältnisse ausgewertet. Im Gegensatz zu PICS können mithilfe der Q-PICS Strategie grundsätzlich auch *non-prime* Sequenzen mittels LC-MS identifiziert werden, da diese nicht durch die positive Anreicherung der proteasegenerierten N-Termini aus dem Probengemisch entfernt werden.

Die Eignung der Q-PICS Methode zur relativen Quantifizierung von proteolytischen Vorgängen wurde exemplarisch anhand der Protease Glu-C in Anwesenheit von zwei verschiedenen Puffersystemen gezeigt [74]. Hierfür wurden drei Replikate einer Peptidbibliothek in TEAB-Puffer und drei Replikate in HEPES-Puffer desselben pH-Wertes mit der Endopeptidase inkubiert. Durch die nachfolgende LC-MALDI TOF/TOF MS Analyse und Auswertung der qualitativen und quantitativen Daten konnte, in Anlehnung an vorangegangene Ergebnisse [120], eine erhöhte proteolytische Aktivität von Glu-C in HEPES-Puffer bestätigt werden. Die Wahl des Puffers hatte hingegen keinen Einfluss auf die Spaltspezifität der Protease.

Die Q-PICS Methode wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst optimiert und nachfolgend zur Analyse der Spaltspezifität von ADAM10 und ADAM17 verwendet. Hierfür wurde unter anderem der Gebrauch von Kontrollen der Peptidbibliotheken implementiert, um falsch-positive Zuordnungen von Spaltstellen auszuschließen. Außerdem wurden die Proben parallel mittels LC-MALDI TOF/TOF MS und LC-ESI LTQ Orbitrap MS analysiert.

5.2 Material und Methoden

5.2.1 Chemikalien

Acetonitril	≥ 99,9%, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
ABC	Sigma-Aldrich
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Bremen, Deutschland)
CHCA	Sigma-Aldrich
FA	98%, Sigma-Aldrich
Formaldehyd	37% (w/w) in Wasser, Sigma-Aldrich
[Glu ¹]-Fibrinopeptid B	<i>Homo sapiens</i> , Sigma-Aldrich
Glu-C	Sigma-Aldrich
HEPES	Sigma-Aldrich
IAA	Sigma-Aldrich
Kalibrationsstandard MALDI MS	4700 Proteomics Analyzer Standard Kit, AB Sciex (Darmstadt, Deutschland)
Lys-C	Promega (Madison, USA)
MilliQ-Wasser	18,2 MΩ/cm, vorbereitet mit dem arium611 System, Sartorius (Göttingen, Deutschland)
NaCl	Sigma-Aldrich
Natriumcyanoborohydrid	5 M in 1 M NaOH, Sigma-Aldrich
NaOH	Sigma-Aldrich
SDS	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TCEP	Sigma-Aldrich
TEAB	1 M, pH 8,5, Sigma-Aldrich
TFA	99%, Sigma-Aldrich
TMT-6plex Label Reagent Set	Thermo Fisher Scientific

5.2.2 Expression und Aufreinigung von ADAM10 und ADAM17

Die Prodomäne und katalytische Domäne von murinem ADAM10 und ADAM17 wurden von Dr. Claudia Tredup und Rielana Wichert aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly (Forschungsprojekt A9, SFB 877) rekombinant in Insektenzellen exprimiert und aufgereinigt [27,121].

5.2.3 Extraktion von zytosolischem Hefeprotein

Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*, CEN.PK113-7D) wurden von Dr. Konstantin Schneider (Universität des Saarlandes) bereitgestellt. Drei Zellpellets von je etwa 100 mg Feuchtgewicht wurden mit jeweils 200 mg einer Mischung von Glasperlen des Durchmessers 0,1–0,25 mm und 0,25–0,5 mm (Retsch, Haan, Deutschland) sowie 200 µl Lysepuffer (100 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7,4) versetzt. In insgesamt fünf Zyklen wurden die Hefezellen in einer Schwingmühle (MM400, Retsch) bei 30 Hz für jeweils 3 min aufgeschlossen. Zwischen den einzelnen Zyklen wurden die Zellpellets bei -80 °C eingefroren und im mit Eis gekühlten Ultraschallbad wieder aufgetaut. Nachfolgend wurde das Lysat von den Glasperlen abgenommen, die Glasperlen in zwei Schritten mit jeweils 100 µl Lysepuffer gewaschen und die Überstände vereinigt. Die im Proteinextrakt enthaltenen Zelltrümmer wurden anschließend bei 50.000 x g und 4 °C für 45 min abzentrifugiert (Heraeus Biofuge Stratos, Thermo Fisher Scientific). Der Proteingehalt des Überstandes wurde mithilfe der BCA-Methode zu 1,68 mg/ml bestimmt.

5.2.4 Herstellung der Lys-C und Glu-C Peptidbibliotheken

Zur Vorbereitung einer Lys-C und einer Glu-C Peptidbibliothek wurde der pH-Wert von jeweils 536 µl (900 µg) Proteinextrakt mit 1 M NaOH auf pH 8,0 eingestellt. Zur Denaturierung und Reduktion von Disulfidbrücken wurden 6,5 µl 2% (w/v) SDS und 58 µl 50 mM TCEP (gelöst in 100 mM HEPES, pH 8,0) zugegeben und der Reaktionsansatz für 1 h bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurden freie Thiolgruppen durch die Zugabe von 29 µl 200 mM IAA (gelöst in 100 mM HEPES, pH 8,0) bei 20 °C für 30 min im Dunkeln alkyliert. Die Proteine wurden nachfolgend mithilfe der *Work* Proteasen Lys-C (Enzym-Protein-Verhältnis, 1:100, w/w) und Glu-C (Enzym-Protein-Verhältnis, 1:50, w/w) bei 37 °C für 20 h verdaut. Freie primäre Amine der Peptid-N-Termini und Lysin-Reste wurden durch reduktive Dimethylierung unter Anwesenheit von 30 mM Formaldehyd und 15 mM Natriumcyanoborohydrid bei 22 °C blockiert. Nach 20 h wurden die Reagenzien erneut zugegeben und der Reaktionsansatz für weitere 9 h bei 22 °C inkubiert. Abschließend wurden die Peptidbibliotheken mithilfe von SPE-Kartuschen (SPE, *Solid Phase Extraction*) (HLB, 3 cc, Oasis, Waters, Milford, USA)

aufgereinigt und die daraufhin im Vakuumkonzentrator (Concentrator Plus, Eppendorf) getrockneten Peptide zu 1,5 mg/ml in 50 mM HEPES (pH 7,4) gelöst.

5.2.5 TMT-6plex-Experimente mit ADAM10/17

Die Lys-C bzw. Glu-C Peptidbibliothek wurde in jeweils sechs internen technischen Replikaten zu jeweils 40 µg (Konzentration, 1,5 mg/ml; Volumen, 26,7 µl) für 18 h bei 37 °C mit jeweils 8 µg ADAM10 bzw. ADAM17 (Enzym-Peptid-Verhältnis, 1:5, w/w; Konzentration, 1 mg/ml; Volumen, 8 µl) in 50 mM HEPES (pH 7,4) inkubiert. Nach 18 h wurden die Proben für 15 min bei 95 °C erhitzt, anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und der pH-Wert der Lösungen mit 1 M TEAB (pH 8,5) auf 8,5 eingestellt. Die TMT-6plex-Reagenzien 126-131 wurden nach Herstellerangaben vorbereitet und zur Derivatisierung der freien proteasegenerierten N-Termini in den jeweils sechs Replikaten verwendet (Abb. 7A). Allgemein wurden 20 µl TMT-6plex-Reagenz (19,5 mg/ml, gelöst in ACN) zur Derivatisierung von 40 µg Peptid eingesetzt und die Proben bei 20 °C für 1 h inkubiert. Um überschüssiges TMT-6plex-Reagenz abzufangen, wurden jeweils 20 µl 100 mM ABC (pH 8,0) zugegeben, die Proben für 15 min bei 20 °C inkubiert und die sechs Replikate eines Experimentes anschließend zu gleichen Teilen (v/v) vereint. Die Proben wurden im Vakuumkonzentrator getrocknet und zu 1 mg/ml in 1% TFA gelöst.

5.2.6 Kontrollen der Peptidbibliotheken

Um in der Peptidbibliothek, trotz reduktiver Dimethylierung, enthaltene freie N-Termini von ADAM10- bzw. ADAM17-generierten N-Termini zu unterscheiden, wurden jeweils 40 µg der Lys-C bzw. Glu-C Peptidbibliothek ohne die Zugabe der *Target* Proteasen bei den gleichen Bedingungen wie in Kapitel 5.2.5 beschrieben inkubiert und anschließend derivatisiert. Anstelle der *Target* Proteasen wurden entsprechend 8 µl 50 mM HEPES (pH 7,4) zugefügt. Für die Derivatisierung primärer Amine in den Kontrollen wurde ausschließlich das TMT-6plex-Reagenz 131 verwendet (Abb. 7B). Die Proben wurden im Vakuumkonzentrator getrocknet und zu 1 mg/ml in 1% TFA gelöst.

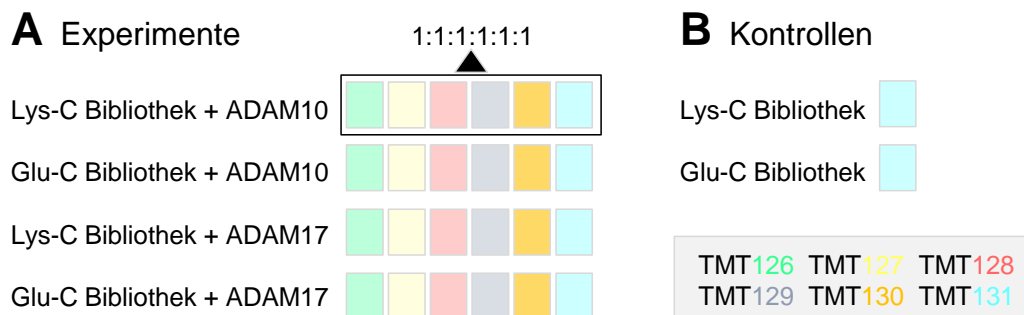


Abb. 7: Zuteilung der TMT-6plex-Reporterionenkanäle 126-131. (A) Die jeweils sechs Replikate der Inkubation der Peptidbibliotheken mit ADAM10/17 wurden jeweils mit den TMT-6plex-Reagenzien 126-131 derivatisiert. (B) Die Kontrollen der Peptidbibliotheken wurden jeweils mit TMT-6plex-Reagenz 131 derivatisiert.

5.2.7 LC-MALDI TOF/TOF MS

Zur *offline* LC-MALDI MS Analyse wurden zunächst jeweils drei technische Replikate jeder Probe aus Kapitel 5.2.5 (Experimente mit ADAM10/17) und 5.2.6 (Kontrollen der Peptidbibliotheken) mithilfe des UltiMate 3000 nano-LC-Systems aufgetrennt und mit einem Probot Mikrofraktionssammler (beides Dionex, Idstein, Deutschland) auf eine MALDI-Platte (Opti-TOF LC/MALDI Insert, 123 x 81 mm, AB Sciex, Darmstadt, Deutschland) gespottet. Hierfür wurden jeweils 2 µg der Probe injiziert und zunächst auf einer Vorsäule (Acclaim Pepmap C18, 300 µm i.D. x 5 mm, 5 µm, 100 Å, Dionex) bei einem Fluss von 30 µl/min mit 3% ACN/0,1% TFA für 10 min konzentriert und entsalzt. Die Temperatur des Säulenofens betrug 30 °C. Anschließend wurden die Analyten durch einen Gradienten aus den Eluenten A (0,05% TFA) und B (80% ACN/0,04% TFA) (Tabelle 2) auf einer Trennsäule (Acclaim Pepmap C18, 75 µm i.D. x 250 mm, 3 µm, 100 Å, Dionex) bei einer Flussrate von 300 nl/min aufgetrennt. Die UV-Spur wurde bei 214 nm aufgezeichnet. Das von der Trennsäule kommende Eluat wurde im Probot Mikrofraktionssammler automatisch mit dem dreifachen Volumen an Matrix (3 mg/ml CHCA, 14 nM [Glu¹]-Fibrinopeptid B, gelöst in 70% ACN/0,1% TFA) versetzt. Im zeitlichen Abstand von 15 s wurde die Probe von 40 bis 163 min auf die MALDI-Platte gespottet.

Die MALDI MS Analyse wurde an einem MALDI TOF/TOF 5800 Massenspektrometer durchgeführt, welches mit der Software 4000 Series Explorer Software (beides AB Sciex) ausgestattet war. Vor der Messung wurde mit einem Standard aus sechs Peptiden im positiven Ionenmodus kalibriert (MS1- und MS2-Ebene). Außerdem wurde auf der

Ebene von MS1-Spektren simultan zur Probenanalyse eine interne Kalibrierung anhand des in der Matrix enthaltenen [Glu¹]-Fibrinopeptid B durchgeführt.

MS1-Spektren wurden mit insgesamt 1.000 Laserschüssen pro Spektrum in einem Massenbereich von 700 bis 4.000 m/z gemessen. Die Vorläuferionen für die MS2 Analysen wurden von der Software nach folgendem Prinzip ausgewählt: minimales Signal-Rausch-Verhältnis, 25; minimale Fraktionsbreite, 1; maximale Anzahl an Vorläuferionen pro Spot, 20. Bei hohem Gasdruck (0,53 mPa) wurden pro Spot zuerst die intensivsten Vorläuferionen fragmentiert. Für die MS2-Spektren wurden insgesamt 3.000 Laserschüsse pro Vorläuferion akkumuliert.

Table 2: Gradient aus den Eluenten A (0,05% TFA) und B (80% ACN/0,04% TFA) zur Trennung des Probengemisches bei einer Flussrate von 300 nl/min und einer Säulenofentemperatur von 30 °C.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	95	5
10	95	5
154	50	50
164	5	95
169	5	95
173	95	5
198	95	5

5.2.8 LC-ESI LTQ Orbitrap MS

Zur *online* LC-ESI MS Analyse wurde ein an ein UltiMate 3000 nano-LC-System (Dionex) gekoppeltes LTQ Orbitrap Velos Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) verwendet, welches mit der Software XCalibur (Version 2.1, Thermo Fisher Scientific) ausgestattet war. Auch hier wurde jede Probe aus Kapitel 5.2.5 (Experimente mit ADAM10/17, S. 29) und 5.2.6 (Kontrollen der Peptidbibliotheken, S. 29) in drei technischen Replikaten gemessen.

Die für die LC Trennung verwendeten Parameter stimmen mit den für LC-MALDI MS beschriebenen überein. Jedoch wurde in den Eluenten A und B, TFA durch FA ersetzt. MS Daten wurden von 15 bis 160 min aufgezeichnet, wobei die MS1-Spektren bei einer Auflösung von 60.000 zwischen 300 und 2.000 m/z aufgenommen wurden. Nach einem MS *Full Scan* wurden die fünf intensivsten Vorläuferionen mit einem Ladungszustand von mindestens $z=2$ durch CID (NCE, *Normalized Collision Energy*, 35%; Isolationsfenster, 2 m/z) und HCD (NCE, 45%; Isolationsfenster, 3 m/z) fragmentiert. Zur Auswahl der Vorläuferionen wurde außerdem ein dynamisches Ausschlussver-

fahren (*Dynamic Exclusion*) mit einer Massentoleranz von 10 ppm und den folgenden Einstellungen verwendet: Anzahl der wiederholten Fragmentierung, 3; Wiederholungszeitfenster, 20 s; Ausschlussdauer, 180 s. Im Anschluss an die MS Analyse wurden die Daten mit dem Programm RecalOffline (XCalibur, Thermo Fisher Scientific) anhand des Signals für Polydimethylcyclsiloxan (445,120025 m/z) rekaliert.

5.2.9 Auswertung der Daten

Zur Identifizierung und Quantifizierung von Peptiden wurde die Software Proteome Discoverer (Version 1.4, Thermo Fisher Scientific) in Kombination mit der Suchmaschine Mascot (Version 2.2.07, Matrix Science, London, UK) verwendet. Die mittels MALDI MS erhaltenen Rohdaten wurden dafür zunächst mit der Software TS2Mascot (Version 1.0.0, Matrix Science) als MGF-Dateien (*Mascot Generic Format*) exportiert. Dabei wurden die folgenden Einstellungen vorgenommen: Export der monoisotopischen MS2 Signale von 60 Da bis 35 Da unterhalb der betreffenden Vorläuferionenmasse; minimales Signal-Rausch-Verhältnis, 0.

Die drei technischen Replikate einer mittels MALDI MS bzw. ESI MS gemessenen Probe wurden im Proteome Discoverer jeweils gemeinsam zur Datenbanksuche eingegeben. Die verwendete FASTA-Datenbank bestand aus insgesamt 6.649 Proteinsequenzen: der Referenzproteomdatenbank von *Saccharomyces cerevisiae* (UniProt, heruntergeladen am 02.05.2013), den Sequenzen von Lys-C (*Lysobacter enzymogenes*), Glu-C (*Staphylococcus aureus*) sowie von ADAM10 und ADAM17 (beide *Mus musculus*). Bei den Datenbanksuchen wurde eine semi-Lys-C (mit maximal einer verpassten Spaltstelle) bzw. semi-Glu-C (mit maximal zwei verpassten Spaltstellen) Enzymspezifität verwendet. Als feste Modifikationen wurden angegeben: Carbamidomethylierung, Cys; Dimethylierung, Lys; TMT-6plex-Derivatisierung, N-Terminus. Die Massentoleranz für Vorläuferionen wurde bei MALDI MS auf 25 ppm, bei ESI MS auf 8 ppm gesetzt. Während für die Fragmentationen bei MALDI MS Daten eine Abweichung von 0,3 Da zugelassen wurde, wurde für ESI MS Daten eine Differenz von 0,5 Da in CID-Spektren und von 0,02 Da in HCD-Spektren erlaubt. In der Quantifizierungsmethode wurden die fünf folgenden TMT-Reporterionenverhältnisse ermittelt: 127/126, 128/126, 129/126, 130/126 und 131/126. Dabei wurden die vom Hersteller für das verwendete TMT-6plex-Kit angegebenen Korrekturfaktoren berücksichtigt, um die Isotopenverunreini-

gung der einzelnen TMT-6plex-Reagenzien auszugleichen. Für MALDI und ESI MS Daten wurde die Percolator Funktion [122] verwendet.

Im Anschluss an die Datenbanksuchen wurden alle PSMs (*Peptide Spectrum Matches*) mit den folgenden Kriterien zur weiteren Auswertung als Textdateien exportiert: maximaler Suchmaschinen-Rang, 1; minimale Sicherheit der Peptididentifizierung (*q-Value*), mittel; maximaler Peptid-Rang, 1. Um falsch-positive ADAM10/17-Spaltstellen auszuschließen, wurden zunächst die in den Kontrollen identifizierten Peptide von den in den entsprechenden Experimenten mit ADAM10/17 identifizierten Peptiden mithilfe eines von Dr. Dennis Linke (Arbeitsgruppe „Systematische Proteomforschung und Bioanalytik“, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) entwickelten VBA-Skriptes [123] subtrahiert. Hierfür wurden zuerst alle in den Kontrollen mittels MALDI und ESI MS identifizierten N-terminal TMT-derivatisierten Peptide für die entsprechende Peptidbibliothek kombiniert. Nachfolgend wurden diese Peptide jeweils von den in den jeweiligen Experimenten mittels MALDI oder ESI MS identifizierten Peptiden subtrahiert, wobei ausschließlich Peptide berücksichtigt wurden, die in mindestens zwei von drei technischen Replikaten identifiziert wurden (Abb. 8).

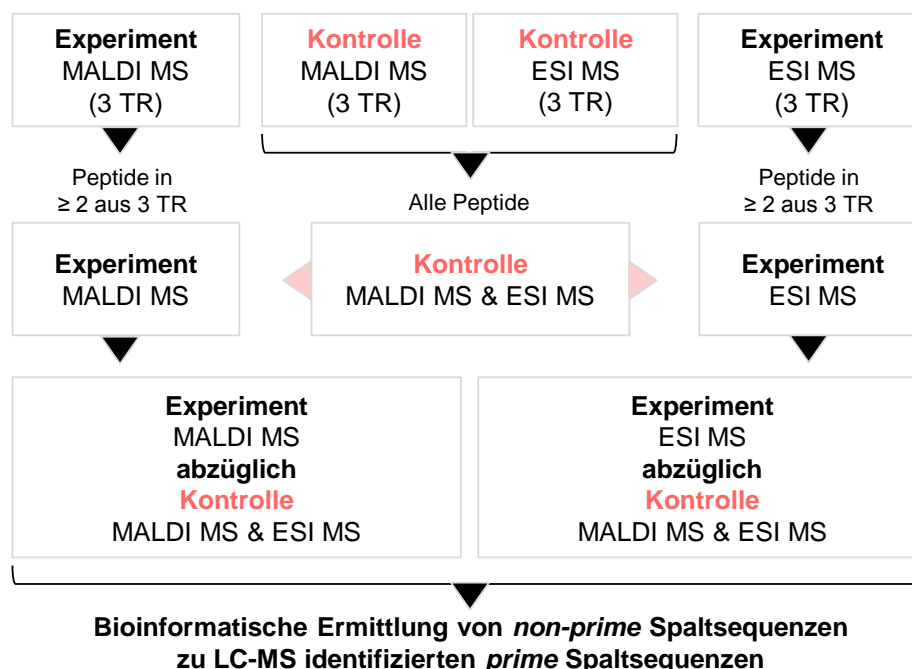


Abb. 8: Strategie zum Umgang mit den in den drei technischen Replikaten (TR) durch MALDI MS bzw. ESI MS identifizierten N-terminal TMT-derivatisierten Peptiden in den Experimenten und Kontrollen.

Anschließend wurden die *non-prime* Spaltsequenzen mithilfe eines zweiten von Dr. Dennis Linke ausgearbeiteten VBA-Skriptes [123] bioinformatisch ermittelt. Dabei wurden die mittels LC-MS identifizierten *prime* Sequenzen zunächst mit der oben beschriebenen FASTA-Datenbank verglichen. Alle möglichen *non-prime* Spaltsequenzen wurden inklusive der zutreffenden Proteinidentifikationsnummern aufgelistet. Nachfolgend wurden Peptide mit der Spaltspezifität von Lys-C (Lys) bzw. Glu-C (Glu, Asp) an der P1 Position aussortiert und nicht weiter berücksichtigt [69]. Bei *prime* Sequenzen, die verschiedenen Proteinidentifikationsnummern zugeordnet werden konnten, wurden ausschließlich übereinstimmende Aminosäuren an den einzelnen *non-prime* Positionen einbezogen [69]; unterscheidende Positionen wurden hingegen als „x“ annotiert. Weiter wurden Peptide, die zu den Proteasen ADAM10 bzw. ADAM17 selbst gehören, ausgeschlossen. Abschließend wurden die Spaltsequenzen von P5 bis P5' aufgelistet und die Ergebnisse der Spaltspezifitätsanalyse mithilfe des Programmes Gradient Contour Chart (Version 1.0, J-Walk & Associates) und Excel (Version 2007, Microsoft, Redmond, USA) als *Heatmaps* oder mithilfe eines *Online*-Programmes als sogenannte *iceLogos* [124] (<http://iomics.ugent.be/icelogoserver/index.html>) dargestellt. Für die *iceLogos* wurde das Referenzproteom von *Saccharomyces cerevisiae* ausgewählt.

Venn-Diagramme wurden mit der Software Venn Diagram Plotter (Pacific Northwest National Laboratory, <http://omics.pnl.gov/software/VennDiagramPlotter.php>) und unterstützend mit dem *Online*-Programm Venny (Oliveros, J.C. (2007) *VENNY. An interactive Tool for comparing Lists with Venn Diagrams*. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) erstellt.

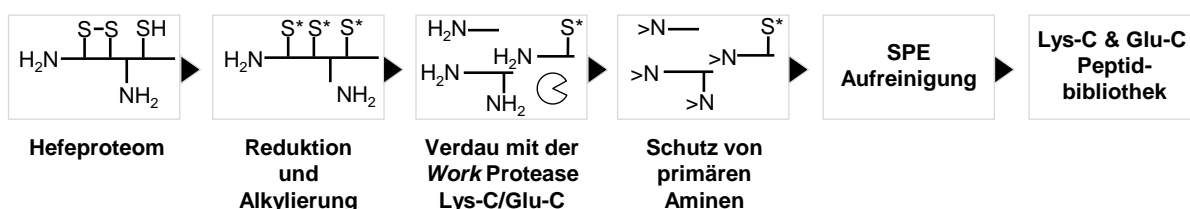
Die quantitativen Daten der Experimente wurden in Excel ausgewertet. MALDI und ESI MS Daten wurden dabei getrennt voneinander betrachtet. Zunächst wurden Ausreißer der einzelnen Reporterionenverhältnisse unter Einbezug des Interquartilabstandes ermittelt. Geometrische Mittel und Standardabweichungen wurden nachfolgend aus den verbleibenden Werten berechnet [125].

5.3 Ergebnisse und Diskussion

5.3.1 Analytische Strategie

Zur Q-PICS Analyse der Spaltspezifität von murinem rekombinantem ADAM10 und ADAM17 wurden zunächst zwei Peptidbibliotheken auf Basis des zytosolischen Proteoms von *Saccharomyces cerevisiae* hergestellt (Abb. 9A). Die Spaltspezifität von Säugetierproteasen kann grundsätzlich mithilfe von Peptidbibliotheken, die aus Organismen niedrigerer Komplexität hervorgehen, untersucht werden. Dies wurde beispielhaft in einer PICS Analyse mit humanem MMP-2 und einer *Escherichia coli* Peptidbibliothek gezeigt [126].

A Herstellung von Peptidbibliotheken



B Experimente und Kontrollen

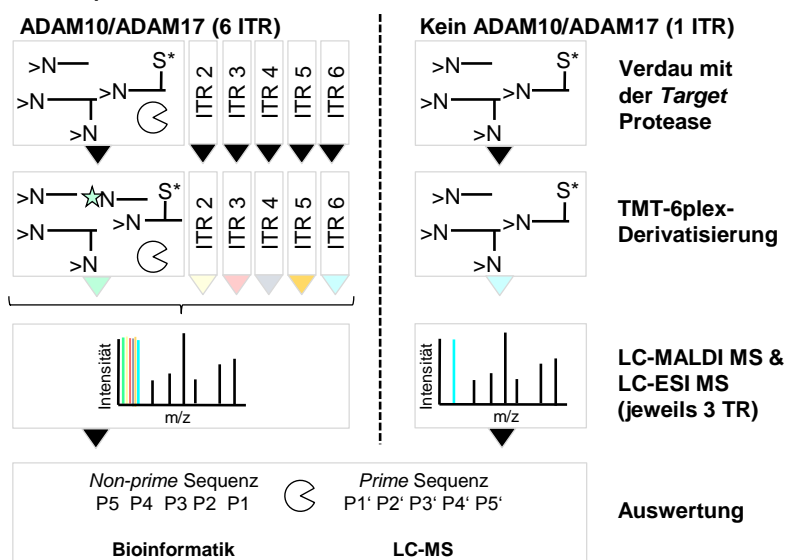


Abb. 9: Arbeitsablauf. (A) Herstellung von zwei Peptidbibliotheken aus einem Hefeproteom mithilfe der Work Proteasen Lys-C bzw. Glu-C. (B) Ausführung von Experimenten mit der Target Protease und Kontrollen der Bibliotheken. Jeweils sechs interne technische Replikate (ITR) der Lys-C bzw. Glu-C Bibliothek wurden mit ADAM10 bzw. ADAM17 inkubiert, freie primäre Amine mit den TMT-6plex-Reagenzien 126 bis 131 derivatisiert und die Proben zu gleichen Teilen vereinigt. Parallel wurde jeweils ein Replikat der Lys-C bzw. Glu-C Bibliothek ohne die Zugabe der Target Protease inkubiert und freie primäre Amine mit TMT-6plex-Reagenz 131 derivatisiert. Alle Proben wurden jeweils in drei technischen Replikaten (TR) sowohl mittels LC-MALDI MS als auch LC-ESI MS analysiert. Non-prime Sequenzen wurden nach Abzug der in den Kontrollen identifizierten Peptide bioinformatisch ermittelt.

Bei der Zellyse wurde im Vergleich zum originalen Q-PICS Protokoll [74] auf den Zusatz von Proteaseinhibitoren, wie EDTA, verzichtet, um einen späteren negativen Einfluss auf die Aktivität der zu untersuchenden Metalloproteasen zu vermeiden. Darüber hinaus wurden die extrahierten Hefeproteine nicht in Anwesenheit einer hohen Konzentration von Urea (8 M) denaturiert und erhitzt, da dies die Entstehung von Carbamylierungsaddukten [127] an Cystein-, Arginin- sowie Lysin-Resten fördert. Außerdem konnte auf diese Weise auf eine Proteinaufreinigung mithilfe von Zentrifugeneinheiten verzichtet und eine potentiell inhibierende Wirkung von kleinsten Rückständen von Urea auf die nachfolgend eingesetzten *Work* und *Target* Proteasen ausgeschlossen werden.

Nach Reduktion von Disulfidbrücken und Alkylierung der freien Thiolgruppen von Cysteinen wurden die Proteine ohne zusätzliche Aufreinigungsschritte entweder mit der *Work* Protease Lys-C oder Glu-C verdaut. Während Lys-C Peptidbindungen spezifisch C-terminal von der basischen Aminosäure Lysin hydrolysiert [128], bevorzugt Glu-C die sauren Aminosäuren Glutaminsäure und zu einem geringeren Ausmaß Asparaginsäure an der P1 Position [120,129]. Die Wahl einer geeigneten *Work* Protease ist von großer Bedeutung, da sich deren Spaltspezifität mit der der *Target* Protease überschneiden kann. Deshalb sollten, um sicher zu gehen, grundsätzlich mindestens zwei Peptidbibliotheken mithilfe von *Work* Proteasen komplementärer Spaltspezifität hergestellt werden. Im Anschluss an den Proteinverdau wurden primäre Amine durch reduktive Dimethylierung blockiert und die derivatisierten Peptide abschließend durch SPE-Kartuschen aufgereinigt.

Die Lys-C und Glu-C Bibliothek wurden in je sechs internen technischen Replikaten jeweils mit murinem rekombinantem ADAM10 bzw. ADAM17 inkubiert (Abb. 9B), wobei es sich ausschließlich um die Prodomäne und katalytische Domäne der Metalloproteasen handelte (Abb. 10). Demnach lagen die verkürzten *Target* Proteasen nicht an eine Zellmembran gebunden, sondern in Lösung vor. Um eine korrekte Faltung der Proteasen zu garantieren, wurden die Enzyme zum einen in eukaryotischen Zellen und zum anderen inklusive der Prodomäne exprimiert, welche wie bereits erwähnt als Chaperon fungiert. Der inhibitorische Effekt der Prodomäne auf die Aktivität der Metalloproteasen wurde hingegen vernachlässigt. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Hydrolyse der Proform von TNF- α (proTNF- α) durch ADAM17 unabhängig von der Maturation der *Sheddase* durch Furin erfolgt [130].

dieser Zeit potentiell durch die Aktivität von Lys-C bzw. Glu-C neu entstandenen N-Termini durch den hohen Überschuss von Derivatisierungsreagenzien unverzüglich blockiert werden. Letztendlich wurden die *Work* Proteasen im Anschluss an die reduktive Dimethylierung durch den Gebrauch von SPE-Kartuschen aus den Peptidbibliotheken entfernt. Zusammengefasst lassen sich freie primäre Amine daher eher durch eine unvollständig ablaufende Dimethylierungsreaktion erklären.

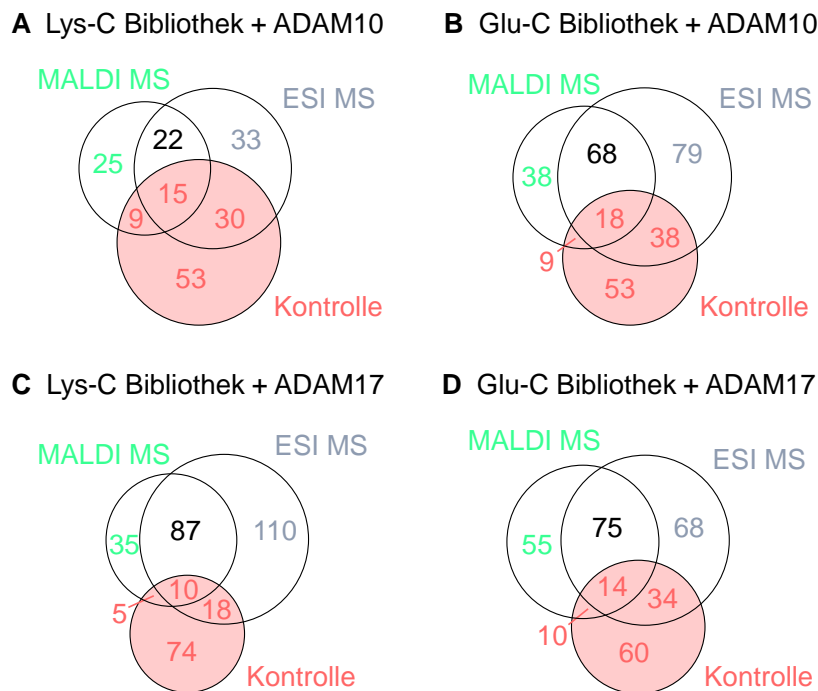


Abb. 11: Venn-Diagramme zu den identifizierten Peptiden in den Kontrollen der Peptidbibliotheken (MALDI und ESI MS kombiniert) sowie den mittels MALDI MS bzw. ESI MS identifizierten Peptiden in den jeweiligen Experimenten (mindestens in zwei von drei technischen Replikaten identifiziert). (A) Lys-C Bibliothek + ADAM10. (B) Glu-C Bibliothek + ADAM10. (C) Lys-C Bibliothek + ADAM17. (D) Glu-C Bibliothek + ADAM17.

Im Anschluss an die Datenbanksuchen wurden die in der entsprechenden Kontrolle identifizierten Peptide von den in den Experimenten identifizierten Peptiden abgezogen (Abb. 11). In der Lys-C Bibliothek wurden mittels MALDI MS und ESI MS insgesamt 107, in der Glu-C Bibliothek 118 Peptide mit N-terminaler TMT-6plex-Derivatisierung in den Kontrollen ermittelt. Nach Vergleich der Peptidlisten von Kontrollen und Experimenten wurden beispielsweise 12% der für ADAM17 in der Lys-C Bibliothek identifizierten Peptide aus dem Datensatz entfernt (Abb. 11C). In den anderen Experimenten mussten hingegen bis zu 40% der identifizierten Peptide aufgrund des gleichzeitigen Auftretens in der Kontrolle ausgeschlossen werden. Außerdem wurden alle übrigen Peptide mit der P1 Spaltspezifität der jeweiligen *Work* Protease entfernt. Entsprechend wurden Peptide

mit Lysin an P1 aus den Experimenten mit der Lys-C Bibliothek und Peptide mit Glutaminsäure bzw. Asparaginsäure an dieser Position aus den Experimenten mit der Glu-C Bibliothek entfernt.

Erwartungsgemäß würde es sich bei den durch die Kontrollen ausgeschlossenen Peptiden nahezu vollständig um Peptide mit der Spaltspezifität von Lys-C bzw. Glu-C an der P1 Position handeln, was den Einsatz von zusätzlichen Kontrollen nicht zwingend notwendig machen würde. Jedoch wurde beispielsweise anhand der Experimente mit ADAM10 festgestellt, dass mehr als ein Drittel der entfernten Peptide andere Aminosäuren als Lysin bzw. Glutaminsäure oder Asparaginsäure an dieser Position aufwiesen. Diese Spaltstellen könnten zum einen durch die Aktivität hefeeigner Proteasen vor bzw. während der Zellyse erklärt werden. Zum anderen könnte deren Ursprung auf eine eingeschränkte Spaltspezifität der verwendeten *Work* Proteasen zurückgeführt werden. Für Lys-C wurde beispielsweise gezeigt, dass das Enzym mit geringerer Affinität auch Peptidbindungen C-terminal von anderen Aminosäuren als Lysin hydrolysiert [128]. Dabei konnte jedoch kein reguläres Muster erkannt werden. In der Konsequenz ist der alleinige theoretische Ausschluss von Peptiden mit der P1 Spaltspezifität der *Work* Protease nicht ausreichend. Eine LC-MS Analyse der Peptidbibliotheken ist deshalb unabdingbar und bietet eine einfache Möglichkeit falsch-positiv identifizierte Spaltstellen zu vermeiden.

5.3.2 Spaltspezifität von ADAM10 und ADAM17

Grundsätzlich sind sowohl gemeinsame als auch spezifische *in vivo* Substrate von ADAM10 und ADAM17 bekannt. In dieser Studie wurden die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der nahe verwandten Proteasen hinsichtlich der Spaltspezifität anhand von Peptidbibliotheken untersucht.

In der MEROPS Datenbank [35] werden für ADAM10 und ADAM17 ausschließlich 40 bzw. 60 Spaltstellen aufgelistet. Mithilfe der Q-PICS Strategie konnten hingegen insgesamt über 580 Spaltstellen identifiziert werden; 218 für ADAM10 (69 in der Lys-C und 149 in der Glu-C Bibliothek) und 365 für ADAM17 (197 in der Lys-C und 168 in der Glu-C Bibliothek) (Auflistung der einzelnen Spaltstellen, Anhang, Tabelle A1, Tabelle A2, Tabelle A3 und Tabelle A4, S. 129 ff.). Die Ergebnisse wurden als *Heatmaps* und *iceLogos* [124], die zusätzlich die natürliche Aminosäureverteilung des Hefeproteoms berücksichtigen, dargestellt (Abb. 12B-D). Die Größe der einzelnen Buchstaben in den *iceLogos*

stellt, bezogen auf die Häufigkeit einzelner Aminosäuren im Referenzproteom, den prozentualen Unterschied des Auftretens einer Aminosäure an einer bestimmten Position um die Spaltstelle (Positionen P5 bis P5') dar. Während Aminosäuren oberhalb der x-Achse an der bezeichneten Position überrepräsentiert vorkommen, treten Aminosäuren unterhalb der x-Achse unterrepräsentiert auf.

In der Lys-C Peptidbibliothek wurden 38, in der Glu-C Peptidbibliothek entsprechend 71 gemeinsame Spaltstellen von ADAM10 und ADAM17 identifiziert (Abb. 12A). Dabei wurde eine Präferenz für Leucin an der P1' Position beobachtet (Abb. 12B). An der P1 Position der Spaltstelle wurden hingegen hauptsächlich die neutralen Aminosäuren Alanin und Prolin sowie die basische Aminosäure Arginin beobachtet. Um den Unterschied der beiden Proteasen hinsichtlich ihrer Spaltspezifität zu verdeutlichen, wurden außerdem die ausschließlich für eine der beiden Proteasen identifizierten Spaltstellen dargestellt (ADAM10, Abb. 12C; ADAM17, Abb. 12D).

Heatmap und *iceLogo* der ausschließlich für ADAM10 identifizierten Spaltstellen veranschaulichen eine Präferenz sowohl für Leucin als auch aromatische Aminosäuren, wie Phenylalanin und Tyrosin, an der P1' Position (Abb. 12C). An der P1 Position zieht die Protease, neben den bereits erwähnten Aminosäuren Alanin, Prolin und Arginin, aromatische Aminosäuren, wie Tyrosin und Phenylalanin, vor. Durch die Verwendung der Glu-C Bibliothek konnte außerdem das vermehrte Auftreten von (dimethyliertem) Lysin an der P1 Position beobachtet werden (Anhang, Abb. A1B, S. 142).

Bei ADAM17 wurde eine deutliche Präferenz für Valin an der P1' Position festgestellt (Abb. 12D). Im Gegensatz zu ADAM10 traten kaum aromatische Aminosäuren an P1' auf. An der P1 Position wurden, wie schon bei ADAM10, vermehrt die Aminosäuren Alanin und Prolin beobachtet. Basische Aminosäuren und die aromatische Aminosäure Phenylalanin traten im Vergleich zu ADAM10 mit geringerer Wahrscheinlichkeit an dieser Position auf (Anhang, Abb. A1C, D, S. 142).

Für beide Proteasen wurden an den P5 bis P2 bzw. P2' bis P5' Positionen im Allgemeinen eher neutrale oder aliphatische Aminosäuren beobachtet. Darüber hinaus treten basische Aminosäuren mit leicht erhöhter Wahrscheinlichkeit an der P2' Position auf (Anhang, Abb. A1, S. 142). ADAM10 scheint zusätzlich Asparaginsäure an der P3' und P4' Position vorzuziehen.

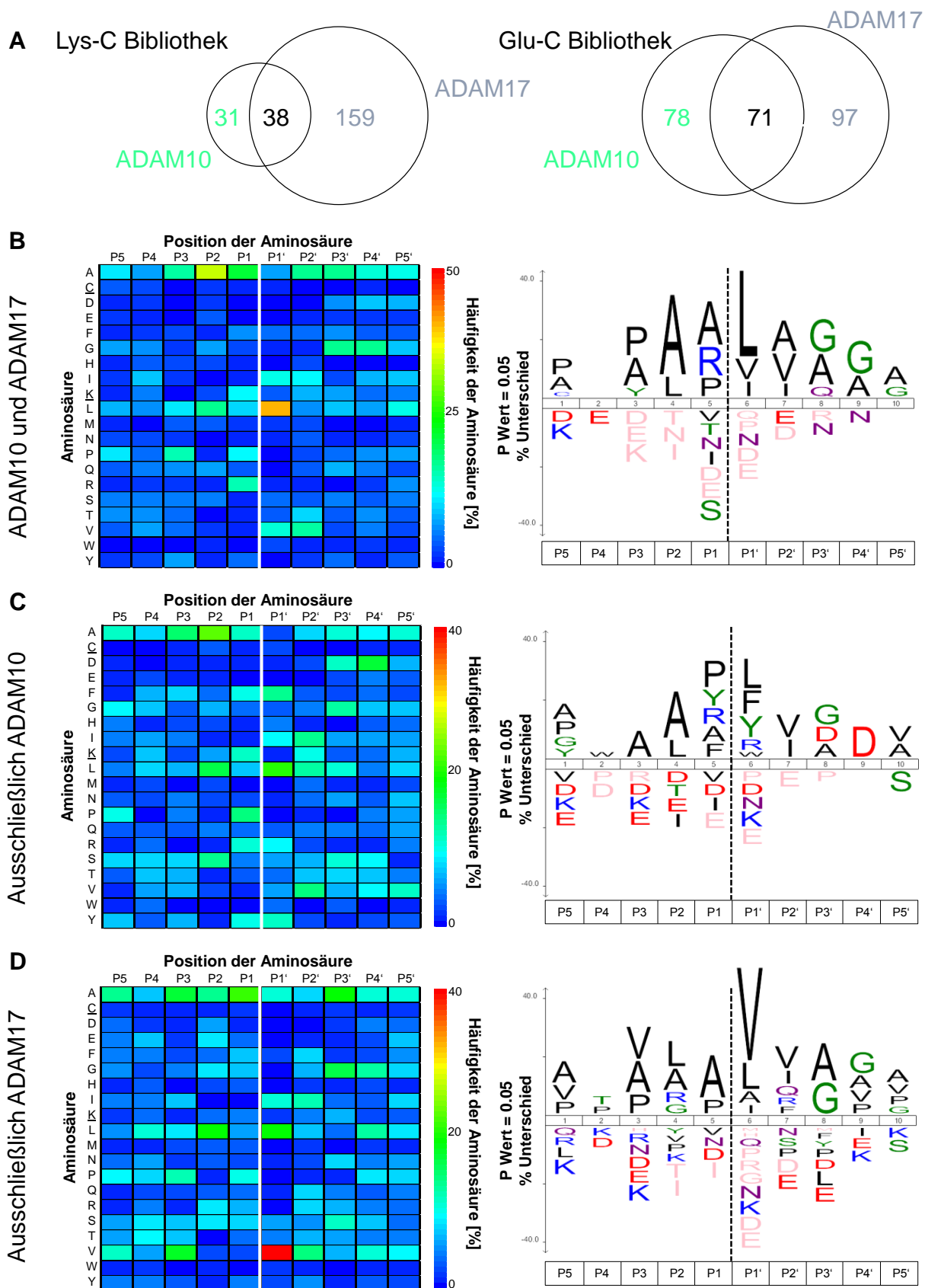


Abb. 12: Legende auf der nächsten Seite.

Abb. 12: Spaltspezifität von ADAM10 und ADAM17. (A) Venn-Diagramme zu gemeinsamen ADAM10 und ADAM17 Spaltstellen in der Lys-C (n=38) bzw. Glu-C (n=71) Bibliothek. (B) Heatmap und iceLogo für insgesamt 109 gemeinsame ADAM10/17 Spaltstellen; 38 Spaltstellen in der Lys-C Bibliothek + 71 in der Glu-C Bibliothek. (C) Heatmap und iceLogo für 109 spezifische ADAM10 Spaltstellen; 31 Spaltstellen in der Lys-C Bibliothek + 78 in der Glu-C Bibliothek. (D) Heatmap und iceLogo für 256 spezifische ADAM17 Spaltstellen; 159 Spaltstellen in der Lys-C Bibliothek + 97 in der Glu-C Bibliothek. C = Carbamidomethyliertes Cystein. K = Dimethyliertes Lysin. Die Spaltstelle zwischen P1 und P1' wurde in den Heatmaps mit einer weißen Linie und in den iceLogos mit einer schwarzen gestrichelten Linie gekennzeichnet.

Insgesamt wurden für ADAM10 deutlich mehr Spaltstellen in der Glu-C Bibliothek beobachtet (69 Spaltstellen in der Lys-C gegenüber 149 in der Glu-C Bibliothek), während für ADAM17 mehr Spaltstellen in der Lys-C Bibliothek (197 Spaltstellen in der Lys-C gegenüber 168 in der Glu-C Bibliothek) identifiziert wurden. Aus dieser Tatsache kann auf eine erhöhte Präferenz von ADAM10 für basische Aminosäuren, insbesondere für (dimethyliertes) Lysin, an der P1 Position geschlossen werden. Diese Beobachtung spricht für die Verwendung von mindestens zwei komplementären Peptidbibliotheken, da auf diese Weise überlappende Spaltspezifitäten von *Work* und *Target* Proteasen, wie beispielsweise im hier vorliegenden Fall von Lys-C und ADAM10, ausgeglichen werden können.

Astazin-Proteasen, wie Meprin- α und Meprin- β , und MMPs zählen wie ADAMs zur Metzinkin Superfamilie. Für verschiedene Vertreter der MMPs konnte, ähnlich wie für die hier behandelten *Target* Proteasen ADAM10 und ADAM17, vor allem eine Präferenz für Leucin an der P1' Position festgestellt werden [69,73,90]. Im Gegensatz dazu bevorzugen Meprin- α und vor allem Meprin- β die Hydrolyse von Peptidbindungen mit sauren Aminosäuren an der P1' Position [70]. Für ADAM10 und ADAM17 wurde beobachtet, dass das Auftreten von Asparaginsäure oder Glutaminsäure an dieser Position äußerst unwahrscheinlich ist.

Die mithilfe von Q-PICS ermittelten Spaltspezifitäten für ADAM10 und ADAM17 sind in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der bis dato umfangreichsten vorangegangenen Studie [118]. Dabei wurde der größte Unterschied in der Spaltspezifität der nahe miteinander verwandten Proteasen mithilfe einer synthetischen Zufallsbibliothek (Acetyl-XXXXXXXXXXXX-amid) und Edman-Sequenzierung an der P1' Position festgestellt: während ADAM17 Valin vorzieht, präferiert ADAM10 eher Leucin und aromatische Aminosäuren an dieser Position. Zur Bestimmung der *non-prime* Präferenzen der beiden Proteasen wurden zwei Peptidbibliotheken mit variablen *non-*

prime und konstanten *prime* Sequenzen (MAXXXXLRGAARE(K-Biotin)-amid und MAXXXXLKGGGKK(K-Biotin)-amid) synthetisiert. An der P1 Position wurde bei beiden Proteasen ein vergleichsweise leicht erhöhtes Vorkommen von Alanin und Prolin festgestellt. Das Festlegen der *prime* Sequenz könnte ein möglicher Grund dafür sein, dass insbesondere für ADAM10 mit diesem Ansatz kein verstärktes Auftreten von basischen Aminosäuren an dieser Position beobachtet wurde.

Die in der vorliegenden Studie erhaltenen Ergebnisse wurden außerdem mit publizierten Spaltstellen in physiologischen Substraten von ADAM10 und ADAM17 verglichen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Bekannte ADAM10 bzw. ADAM17 Spaltstellen (P5-P1 ↓ P1'-P5') in physiologischen Substraten. Abkürzungen: APP, Amyloid Precursor Protein (engl.); RANKL, Receptor Activator of NF-κB Ligand (engl.); TNF-α, Tumornekrosefaktor-α; IL-6R, Interleukin-6-Rezeptor; Ebola GP, Ebola Glykoprotein; PrP^C, zelluläres Prion-Protein. Referenzen, siehe Text.

Substrat	Protease	Spaltstelle (P5-P1 ↓ P1'-P5')
APP	ADAM10	VHHQK ¹⁶ ↓ ¹⁷ LVFFA
N-Cadherin	ADAM10	TDVDR ⁷¹⁴ ↓ ⁷¹⁵ IVGAG
RANKL	ADAM10	VGPQR ¹³⁸ ↓ ¹³⁹ FSGAP
proTNF-α	ADAM17	PLAQA ⁷⁶ ↓ ⁷⁷ VRSSS
IL-6R	ADAM17	SLPVQ ³⁵⁷ ↓ ³⁵⁸ DSSSV
Ebola GP	ADAM17	KTLPD ⁶³⁷ ↓ ⁶³⁸ QGDND
Klotho	ADAM10/17	α1: PGPET ⁹⁵⁸ ↓ ⁹⁵⁹ LERFC
	ADAM10/17	α2: nicht bekannt
PrP ^C	ADAM10/17	AAAGA ¹¹⁹ ↓ ¹²⁰ VVGGGL
	ADAM10	AYYDG ²²⁷ ↓ ²²⁸ RRSSS

Das mit der Alzheimer-Krankheit in Zusammenhang stehende APP wird im nicht-amyloidogenen Reaktionsweg von der hauptverantwortlichen α-Sekretase ADAM10 zwischen Lys-16 und Leu-17 (VHHQK¹⁶ ↓ ¹⁷LVFFA) [131] gespalten, wobei das lösliche sAPPα sowie ein C-terminales membranständiges Fragment entstehen. Die Spaltstelle wurde mithilfe eines synthetischen Peptides und LC-MS bestimmt. Mit der basischen Aminosäure Lysin an P1 und der aliphatischen Aminosäure Leucin an P1' stimmt die Spaltstelle mit der durch Q-PICS erhaltenen Spaltspezifität überein.

Das Adhäsionsprotein N-Cadherin, ein weiteres Substrat von ADAM10, trägt unter anderem zur Ausbildung von Synapsen bei. Die durch Genmutationsexperimente identifizierte Spaltstelle befindet sich zwischen Arg-714 und Ile-715 (TDVDR⁷¹⁴ ↓ ⁷¹⁵IVGAG) [132], was erneut zu den hier mittels Q-PICS erhaltenen Ergebnissen passt.

Ein weiteres spezifisch für ADAM10 bestimmtes Substrat ist RANKL (*Receptor Activator of NF- κ B Ligand*), wobei es sich um ein für die Entwicklung von Osteoklasten wichtiges Transmembranprotein handelt. Die Spaltstelle zwischen Arg-138 und Phe-139 (VGPQR¹³⁸ ↓ ¹³⁹FSGAP) [133] wurde durch die N-terminale Analyse des löslichen RANKL Spaltproduktes bestimmt. Auch diese Spaltstelle mit einer basischen Aminosäure an der P1 und einer aromatischen Aminosäure an der P1' Position steht in Einklang mit den durch Q-PICS erhaltenen Ergebnissen für ADAM10.

TNF- α , ein proinflammatorisches Zytokin, wird durch die ADAM17-vermittelte Hydrolyse von der membranständigen Proform, einem Typ-2-Transmembranprotein, freigesetzt. Weit bevor ADAM17/TACE als die für die Hydrolyse verantwortliche Protease identifiziert wurde [111–113], wurde der N-Terminus des löslichen Zytokines und damit die Spaltstelle zwischen Ala-76 und Val-77 (PLAQA⁷⁶ ↓ ⁷⁷VRSSS) [134,135] der Proform (proTNF- α) ermittelt. Mit Alanin an P1, Valin an P1' und einer basischen Aminosäure an der P2' Position ist diese Spaltstelle konform mit den erhaltenen Ergebnissen für ADAM17. Basierend auf dieser Spaltsequenz wurden in einer früheren Studie zehn fluorogene Peptide mit unterschiedlichen P1 und P1' Positionen synthetisiert (Flu-LAQXXRSSSR-Que; Flu, Fluorophor; Que, Quencher) und deren Hydrolyseraten bestimmt [116]. Dabei wurde festgestellt, dass ADAM17 von allen zehn möglichen Peptiden die Proteolyse zwischen Alanin und Valin, in Anlehnung an die originale Spaltstelle, bevorzugt. Außerdem wurde für Peptidbindungen zwischen Alanin und Isoleucin, Alanin und Leucin sowie Phenylalanin und Valin eine vergleichsweise hohe Hydrolyserate beobachtet. Demgegenüber wurden die fluorogenen Substrate mit Glycin und Valin bzw. Valin und Alanin an P1 und P1' nur zu einem geringen Anteil von ADAM17 hydrolysiert. Diese Ergebnisse sind größtenteils konform mit den mithilfe von Q-PICS ermittelten Daten für ADAM17. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Anwesenheit des N-terminalen Fluorophors und des C-terminalen Quenchers einen Einfluss auf die Substrataffinität der Protease ausübt. So konnten die Autoren zeigen, dass der k_{cat} Wert der durch ADAM17 katalysierten Hydrolyse des fluorogenen Substrates Flu-

LAQAVRSSSR-Que 64 mal höher als der des underivatisierten Substrates LAQAVRSSSR war.

Eine weitere Studie, die basierend auf der Spaltsequenz von ADAM17 in proTNF- α durchgeführt wurde, untersuchte die P1' und P2' Spaltspezifität der Protease mit dem Ziel selektive Hydroxamsäureinhibitoren zu entdecken [117]. Zu diesem Zweck wurde eine Peptidbibliothek der Form Biotin-LAQAXSSK(Dnp)-NH₂ (Dnp, Dinitrophenol) synthetisiert, wobei für die P1' und P2' Position insgesamt 50 verschiedene natürliche sowie unnatürliche Aminosäuren verwendet wurden. Nach Behandlung der Bibliothek mit der *Target* Protease ADAM17 und anschließender Entfernung biotinylierter Analyten aus dem Reaktionsgemisch wurden die C-terminalen Spaltprodukte mittels LC-MS analysiert. Während für die P1' Position Leucin und Valin als die bevorzugten Aminosäuren identifiziert wurden, wurden für die P2' Position vornehmlich basische Aminosäuren bestimmt. Dieses Fazit stimmt mit den durch Q-PICS erhaltenen Ergebnissen überein.

Der lösliche IL-6-Rezeptor, sIL-6R, wird durch die Hydrolyse der Peptidbindung zwischen Gln-357 und Asp-358 (SLPVQ³⁵⁷ ↓ ³⁵⁸DSSSV) [136] durch ADAM17 von der membranständigen für den klassischen IL-6 Signalweg verantwortlichen Form freigesetzt. Die Spaltstelle wurde durch Genmutationsexperimente sowie C-terminale Aminosäureanalyse unter der Zuhilfenahme der Carboxypeptidasen P und Y ermittelt. Ähnlich wie bei TNF- α wurde zuerst die Spaltstelle und später eine dafür verantwortliche Protease identifiziert [137]. Die vorliegende Spaltsequenz ist jedoch nicht konform mit den durch Q-PICS erhaltenen Ergebnissen für die Spaltspezifität von ADAM17. Kürzlich konnte in einem von der vorliegenden Studie unabhängigen arbeitsgruppeninternen Projekt gezeigt werden, dass die Spaltstelle nicht wie angenommen zwischen Gln-357 und Asp-358, sondern zwischen Pro-355 und Val-356 lokalisiert ist (noch nicht publiziert, Prasath Somasundaram, Dr. Tomas Koudelka, Dr. Chien-Wen Hung und Prof. Dr. Andreas Tholey, 2014). Hierfür wurde der C-Terminus von sIL-6R mithilfe eines chymotryptischen Verdaus in 50% H₂¹⁸O [138] und anschließender LC-MS Analyse bestimmt. Diese Ergebnisse werden zusätzlich von der durch Q-PICS ermittelten Spaltspezifität für ADAM17 gestützt.

Mit der Zuordnung von ADAM17 als die für das *Shedding* von Ebola GP (Ebola Glykoprotein) verantwortliche Protease wurde erstmals ein viruscodiertes Transmem-

branprotein als Substrat einer ADAM-Protease identifiziert [139]. Die Spaltstelle wurde durch Genmutationsexperimente sowie MS Analysen zwischen Asp-637 und Gln-638 und (KTLPD⁶³⁷ ↓ ⁶³⁸QGDND) zugeordnet. Überraschenderweise passen weder die P1, noch die P1' Position der Spaltstelle zu der mittels Q-PICS ermittelten Spaltspezifität von ADAM17. Eine nähere Betrachtung der Auswertung der erhaltenen MS Daten [139] lässt jedoch Zweifel an der Richtigkeit der publizierten Spaltstelle aufkommen. Die Autoren gingen wie folgt vor: (i) Isolation von löslichem Ebola GP aus dem Medium von Ebola-infizierten Zellen, (ii) N-Deglykosylierung mit PNGase F (Peptid-N-Glykosidase F), (iii) Reduktion von Disulfidbrücken, (iv) Alkylierung von freien Thiolgruppen mit IAA und (v) Analyse des Spaltproduktes mittels MALDI MS. Im Massenspektrum wurde neben PNGase F das Ebola GP-Spaltprodukt, genannt GP_{2Δ}, bei 15.551 *m/z* mit äußerst niedriger Auflösung detektiert. Aufgrund der Ionisierung mittels MALDI und der theoretisch möglichen Spaltprodukte von Ebola GP konnte von einem einfach positiv geladenen Ion ausgegangen werden. Von 15.551 *m/z* wurden für fünf durch IAA alkylierte Cystein-Reste 215 Da (5 x 43 Da) subtrahiert. Die daraufhin erhaltene Masse von 15.336 *m/z* wurde nachfolgend mit den ungeladenen Massen der theoretisch möglichen Spaltprodukte verglichen (z. B. 15.217 Da für Pro-636 am C-Terminus, 15.332 Da für Asp-637 am C-Terminus, 15.460 Da für Gln-638 am C-Terminus, etc.), woraufhin die ADAM17 Spaltstelle zwischen Asp-637 und Gln-638 lokalisiert wurde. Nach bestem Wissen muss jedoch eine Masse von 285 Da (5 x 57 Da) anstatt von 215 Da (5 x 43 Da) für die durch IAA eingeführte Carbamidomethylierung an Thiolgruppen von 15.551 *m/z* subtrahiert werden. Durch die N-Deglykosylierung mit PNGase F werden aus glykosylierten Asparagin-Resten unmodifizierte Asparaginsäure-Reste. Die Deamidierung resultiert in einer Erhöhung der Proteinmasse um 1 Da; im betreffenden Sequenzabschnitt befinden sich zwei N-Glykosylierungen. In der Konsequenz müssen zusätzlich weitere 2 Da sowie 1 Da für das die positive Ladung verursachende Proton abgezogen werden, um die aus dem Massenspektrum ersichtliche Masse mit den theoretischen ungeladenen Massen der möglichen Spaltprodukte vergleichen zu können. Nach Subtraktion von insgesamt 288 Da bleiben von 15.551 *m/z*, 15.263 Da übrig. Diese Masse liegt zwischen der des C-terminal auf Pro-636 bzw. auf Asp-637 endenden Spaltproduktes. Die niedrige Auflösung des verwendeten MALDI Massenspektrometers erlaubt keine Feststellung der exakten Masse und damit auch keine eindeutige Identifizierung des Spaltproduktes. Durch den Austausch von Asp-637 durch Valin bzw. durch Leucin wurde eine stark

erhöhte Freisetzung von löslichem Ebola GP beobachtet. Im Kontext mit den mittels Q-PICS erhaltenen Ergebnissen für ADAM17 sowie dem fehlerhaft interpretierten Massenspektrum deuten die Ergebnisse dieser Genmutationsexperimente eher auf eine Hydrolyse der Peptidbindung zwischen Pro-636 und Asp-637 hin. Zusammenfassend sollte die bisher zugeordnete Spaltstelle in Ebola GP, beispielsweise mittels hochauflösender *Top-down* Massenspektrometrie, auf ihre Richtigkeit geprüft werden.

Bei dem *Anti-Aging* Protein Klotho handelt es sich um ein Typ-1-Transmembranprotein mit zwei extrazellulären Domänen, KL1 und KL2, das sowohl als Substrat von ADAM10 als auch von ADAM17 identifiziert wurde [140,141]. Dabei wurden zwei Spaltstellen entdeckt: eine nahe an der Zelloberfläche ($\alpha 1$) und eine im Bereich zwischen den Domänen KL1 und KL2 ($\alpha 2$). Kürzlich wurde die exakte Position der $\alpha 1$ Spaltstelle bestimmt [142]. Hierzu wurden Erkennungsmotive der beiden Proteasen, auf der Basis von insgesamt 31 von Caescu *et al.* [118] zusammengestellten bekannten *in vivo* Spaltstellen, generiert. Anhand dieser Erkennungsmuster wurden im vermuteten Bereich der $\alpha 1$ Spaltstelle nahe der Membran zwei potentielle Spaltstellen (PGPET⁹⁵⁸ ↓ ⁹⁵⁹LERFC und PEEFT⁹⁶⁸ ↓ ⁹⁶⁹VCTEC) entdeckt. Durch Genmutationsexperimente wurde eine der beiden Spaltstellen ausgeschlossen und die $\alpha 1$ Spaltstelle zwischen Thr-958 und Leu-959 (PGPET⁹⁵⁸ ↓ ⁹⁵⁹LERFC) lokalisiert. Außerdem wurde ADAM17 als die hauptverantwortliche Protease identifiziert. Die Zuordnung der Spaltstelle wurde nicht mittels LC-MS bestätigt. Mithilfe des Q-PICS Experimentes wurde Threonin als eher unwahrscheinlich an der P1 Position eingestuft, wohingegen Leucin an der P1' Position häufig vertreten ist. Die Aufklärung der $\alpha 2$ Spaltstelle in Klotho steht noch aus.

Das mit der Entstehung von spongiformen Enzephalopathien, wie der Creutzfeld-Jakob-Krankheit, in Zusammenhang stehende zelluläre Prion-Protein (PrP^C), ein Glykoprotein, wird durch einen GPI-Anker (GPI, Glykosylphosphatidylinositol) auf der Oberfläche der Zellmembran fixiert. Bei PrP^C handelt es sich sowohl um ein Substrat von ADAM10 und ADAM17 [143] als auch von ADAM8 [144]. Kürzlich wurden verschiedene durch die benannten Proteasen verursachte Spaltstellen in PrP^C mithilfe einer *Top-down* LC-MS Analyse und zusätzlichen Genmutationsexperimenten untersucht [145]. Demnach hydrolysieren beide Proteasen, ADAM10 und ADAM17, die Peptidbindung zwischen Ala-119 und Val-120 (AAAGA¹¹⁹ ↓ ¹²⁰VVGGL). Die sogenannte $\alpha 3$ Spaltung passt zu den mittels Q-PICS erhaltenen Ergebnissen. Außerdem wurde bestätigt, dass ADAM10 die

Hydrolyse einer zweiten Peptidbindung zwischen Gly-227 und Arg-228 (AYYDG²²⁷ ↓²²⁸RRSSS) in der Nähe des GPI-Ankers katalysiert [146]. Das Auftreten von Glycin an der P1 Position wird anhand der für ADAM10 erhaltenen Q-PICS Ergebnisse als eher unwahrscheinlich eingeordnet. Demgegenüber zeigt das *iceLogo* der spezifischen Spaltereignisse von ADAM10 (Abb. 12C, S. 41) das Auftreten von Arginin an der P1' Position.

Zusammenfassend weisen die *Target* Proteasen ADAM10 und ADAM17 jeweils ein vergleichsweise breites Spaltspezifitätsprofil hinsichtlich der P5 bis P5' Positionen auf; jedoch konnten für beide Proteasen deutliche Präferenzen, insbesondere hinsichtlich der P1 und P1' Positionen, festgestellt werden. Berichtete *in vivo* Spaltstellen zeigen mit wenigen Ausnahmen eine hohe Übereinstimmung mit den durch Q-PICS erhaltenen Ergebnissen.

Es muss jedoch bedacht werden, dass zur *in vitro* Bestimmung der Spaltspezifität lineare Aminosäuresequenzen in Form von Peptidbibliotheken und keine Proteine mit zugehöriger Sekundär-, Tertiär- bzw. Quartärstruktur verwendet wurden. Außerdem lagen die Aminosäuren Cystein und Lysin derivatisiert und damit nicht in ihrer natürlichen Form vor, was ebenfalls einen Einfluss auf die Spaltspezifität der Proteasen haben könnte. Weiter wurden rekombinant hergestellte Proteasen verwendet, die ausschließlich aus der Prodomäne und katalytischen Domäne von ADAM10 bzw. ADAM17 bestanden. In der Folge konnte der Einfluss weiterer *in vivo* vorhandener Domänen sowie die Verankerung in der Zellmembran nicht berücksichtigt werden. Die genannten Punkte könnten Unstimmigkeiten zwischen *in vivo* berichteten Spaltstellen und den mittels Q-PICS ermittelten Spaltspezifitäten erklären.

5.3.3 LC-MALDI und LC-ESI MS

In der vorliegenden Q-PICS Studie wurden im Hinblick auf die Ionenquelle und auch den Massenanalysator zwei komplementäre Technologien der Massenspektrometrie verwendet: MALDI TOF/TOF MS und ESI LTQ Orbitrap MS. Die Probengemische wurden vorher, entweder *offline* oder *online* an das Massenspektrometer gekoppelt, mittels nano-LC aufgetrennt.

Durch die parallele Verwendung von MALDI MS war es möglich, die Anzahl insgesamt identifizierter Spaltstellen je nach Experiment im Vergleich zur alleinigen ESI MS

Analyse um 18 bis 50% zu erhöhen (Abb. 13). Beispielsweise wurden in der Glu-C Bibliothek, die mit ADAM17 inkubiert wurde, insgesamt 168 Spaltstellen identifiziert, wobei von 109 mittels MALDI MS und 120 mittels ESI MS identifizierten Spaltstellen ausschließlich 61 mithilfe beider Technologien zugeordnet werden konnten (Abb. 13D). Folglich kann durch diese Strategie die Datenausbeute erhöht und damit einhergehend die Aussagekraft von erhaltenen Ergebnissen eines Q-PICS Experimentes verbessert werden.

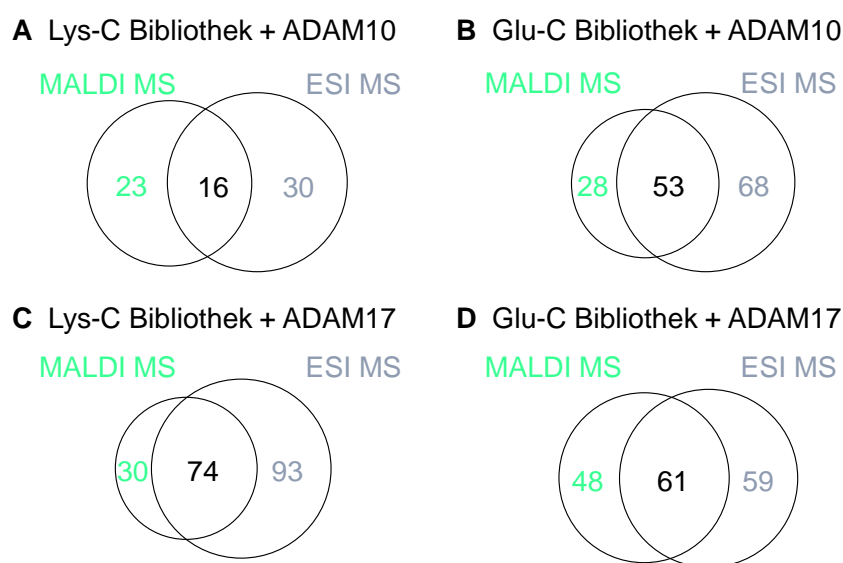


Abb. 13: Venn-Diagramme zu mittels MALDI MS oder ESI MS identifizierten Spaltstellen. (A) Lys-C Bibliothek + ADAM10 ($n=69$). (B) Glu-C Bibliothek + ADAM10 ($n=149$). (C) Lys-C Bibliothek + ADAM17 ($n=197$). (D) Glu-C Bibliothek + ADAM17 ($n=168$).

Beide MS Technologien zeichnen sich jeweils durch bestimmte Vorteile, aber auch Nachteile aus. Ein bedeutender negativer Aspekt von LC-MALDI MS ist der benötigte Zeitaufwand. Während bei LC-ESI MS die LC Trennung des Probengemisches und die massenspektrometrische Analyse durch die *Online*-Kopplung simultan erfolgen, finden diese Schritte bei LC-MALDI MS zeitlich voneinander getrennt statt (*Offline*-Kopplung). Zunächst werden die Proben chromatographisch aufgetrennt, das von der Säule kommende Eluat automatisch mit Matrix (z. B. CHCA) versetzt und die Mischung in definierten Zeitabständen (z. B. 15 s) auf eine MALDI-Platte gespottet. Anschließend wird die MALDI-Platte in das Massenspektrometer geladen und die MS Analyse durchgeführt. Bei den im Zusammenhang mit ADAM10 und ADAM17 durchgeführten Experimenten betrug die Messdauer von drei technischen Replikaten einer Probe inklusive von Blindinjektionen mithilfe von LC-MALDI MS etwa 30 h und mittels LC-ESI

MS lediglich 12 h. Ein weiterer Nachteil von LC-MALDI MS gegenüber LC-ESI MS ist darin begründet, dass die Leistung der chromatographischen Trennung durch die nachfolgende Fraktionierung der Analyten auf der MALDI-Platte eingeschränkt wird. Neben dem erhöhten Zeitaufwand bietet die *Offline*-Kopplung von LC und MS Analyse allerdings auch einige Vorzüge. So werden beispielsweise Vorläuferionen für die MS2 Analyse erst im Anschluss an eine vollständige MS1-Messung der Probe ausgewählt. Dabei besteht gegenüber ESI MS der klare Vorteil, dass diejenigen Fraktionen zur Fragmentierung bestimmter Vorläuferionen herangezogen werden können, in denen über die Zeit die höchste Signalintensität des entsprechenden Ions beobachtet wurde. Ein weiterer Vorteil ist, dass beispielsweise noch nicht eindeutig identifizierte Analyten erneut gemessen werden können. Jedoch hängt der Erfolg einer solchen wiederholten Messung stark vom Ausmaß des vorher durch den Laser verursachten Materialabtrags eines Spots ab.

In einer MALDI Ionenquelle werden in der Regel ausschließlich einfach positiv geladene Ionen generiert. Demgegenüber werden beim ESI Ionisierungsprinzip, abhängig von der Peptidmasse und den strukturellen Eigenschaften, hauptsächlich mehrfach positiv geladene Ionen erzeugt. Hinzu kommt, dass Peptide meist in mehreren Ladungszuständen auftreten, wodurch die Massenspektren im Vergleich zu MALDI MS komplexer erscheinen. Einfach geladene Ionen werden bei ESI MS Analysen oft von der Fragmentierung ausgeschlossen [147]. Dies ist unter anderem in der weitläufig verbreiteten Meinung begründet, dass es sich bei einfach geladenen Ionen größtenteils um chemische Artefakte oder Kontaminationen handelt. Außerdem produzieren mehrfach geladene Ionen bei der Fragmentierung umfassendere b- bzw. y-Ionenserien. Es wurde jedoch gezeigt, dass der Ausschluss von einfach positiv geladenen Ionen bei ESI MS gerade im Hinblick auf die *Bottom-up* Analyse von Verdauen nicht-tryptischen Charakters zu einem Informationsverlust führen kann [148]. Werden Proteine beispielsweise mit Glu-C oder Chymotrypsin anstatt mit Trypsin verdaut, so entstehen theoretisch mehr Peptide, die keine basischen Aminosäuren enthalten. Basische funktionelle Gruppen erleichtern jedoch die Ionisation von Peptiden. In der Folge ist statistisch eine erhöhte Anzahl von einfach positiv geladenen Ionen zu erwarten. Bei der Q-PICS Bestimmung der Spaltspezifität von ADAM10 und ADAM17 wurden bei den ESI MS Analysen einfach geladene Ionen von der Fragmentierung ausgeschlossen. Jedoch konnte wider Erwarten und möglicherweise aufgrund des vergleichsweise kleinen

Datensatzes kein Vorteil der MALDI gegenüber der ESI Technologie bei der Bestimmung von neutralen bzw. sauren Peptiden festgestellt werden. In dieser Studie war es dennoch allgemein von Nutzen, dass mittels MALDI nicht ionisierbare Peptide durch ESI ionisiert und damit detektiert werden konnten, und umgekehrt.

Im Hinblick auf die Massengenauigkeit und Auflösung ist die ESI LTQ Orbitrap MS Technologie der MALDI TOF/TOF MS eindeutig überlegen. Der für die Q-PICS Analyse verwendete Orbitrap Massenanalysator erlaubt eine Massenabweichung von unter 5 ppm auf der Ebene von MS1-Spektren. Diese hohe Massengenauigkeit kommt grundsätzlich der Einschränkung der Anzahl möglicher Peptidtreffer bei der nachfolgenden Datenbanksuche zugute [149]. Dies ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn bei einer proteomischen Analyse Proteasen mit breiter [150] oder wie im Fall von ADAM10 und ADAM17 mit unbekannter Spaltspezifität verwendet werden. Zur Datenbanksuche des Q-PICS Experimentes wurden eine semi-Lys-C bzw. semi-Glu-C Enzymspezifität verwendet, da die durch ADAM10 bzw. ADAM17 entstehenden N-terminal TMT-6plex-derivatisierten Spaltprodukte C-terminal größtenteils die Spaltspezifität von Lys-C bzw. Glu-C aufweisen sollten.

Die Derivatisierung mit den TMT-6plex-Reagenzien 126 bis 131 wurde zur parallelen Analyse von sechs Replikaten jeweils einer proteasekatalysierten Reaktion verwendet. Entsprechend konnten im Vergleich zu einer aufeinanderfolgenden Analyse sechs einzelner Replikate Arbeitsaufwand und Messzeit eingespart werden. Anhand der quantitativen Daten konnte die Reproduzierbarkeit von ADAM10- bzw. ADAM17-katalysierten proteolytischen Vorgängen gezeigt werden. Hierzu wurden die Intensitäten der einzelnen TMT-Reporterionensignale der mittels MALDI MS gewonnenen Daten aus den CID-Spektren und die der mittels ESI MS erhaltenen Daten aus den HCD-Spektren extrahiert. Die Reporterionenverhältnisse 127/126, 128/126, 129/126, 130/126 sowie 131/126 wurden berechnet. Für jedes *Target* Protease Experiment wurden alle PSMs der identifizierten Peptide berücksichtigt; die parallel in den Kontrollen identifizierten Peptide wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Nach der Entfernung von Ausreißern der einzelnen Reporterionenverhältnisse wurden geometrische Mittel und Standardabweichungen für jedes einzelne Experiment und die mittels MALDI MS bzw. ESI MS erhaltenen Daten berechnet (Tabelle 4).

Für das geometrische Mittel der einzelnen Reporterionenverhältnisse liegt der Erwartungswert bei 1,00. Für MALDI MS Analysen lag das geometrische Mittel der

Reporterionenverhältnisse zwischen 0,97 und 1,26; für ESI MS Analysen zwischen 0,82 und 1,21. Die Standardabweichungen der Reporterionenverhältnisse variierten bei den MALDI MS Daten zwischen 0,19 und 0,39 und waren damit höher als die anhand der ESI MS Daten berechneten Standardabweichungen, welche von 0,08 bis 0,12 reichten.

Tabelle 4: Geometrische Mittel und Standardabweichungen (SD) der TMT-6plex-Reporterionenverhältnisse der mittels MALDI MS bzw. ESI MS identifizierten Spaltstellen in den entsprechenden Experimenten.

Experiment	MS Technologie	Geometrisches Mittel der TMT-Reporterionenverhältnisse \pm SD				
		127/126	128/126	129/126	130/126	131/126
Lys-C Bibliothek + ADAM10	MALDI MS	1,20 \pm 0,32	1,17 \pm 0,34	1,26 \pm 0,39	1,20 \pm 0,32	1,22 \pm 0,31
	ESI MS	1,15 \pm 0,12	1,06 \pm 0,09	1,09 \pm 0,11	1,02 \pm 0,10	1,21 \pm 0,12
Glu-C Bibliothek + ADAM10	MALDI MS	1,00 \pm 0,20	1,07 \pm 0,20	1,18 \pm 0,23	1,05 \pm 0,26	1,07 \pm 0,22
	ESI MS	0,87 \pm 0,08	0,95 \pm 0,09	0,97 \pm 0,08	0,88 \pm 0,10	1,03 \pm 0,09
Lys-C Bibliothek + ADAM17	MALDI MS	1,05 \pm 0,22	1,05 \pm 0,19	1,16 \pm 0,26	1,13 \pm 0,23	0,99 \pm 0,19
	ESI MS	0,96 \pm 0,09	0,96 \pm 0,08	0,96 \pm 0,08	0,99 \pm 0,10	0,94 \pm 0,09
Glu-C Bibliothek + ADAM17	MALDI MS	0,98 \pm 0,21	0,97 \pm 0,22	1,10 \pm 0,28	0,99 \pm 0,22	0,98 \pm 0,21
	ESI MS	0,83 \pm 0,11	0,84 \pm 0,10	0,85 \pm 0,09	0,82 \pm 0,11	0,94 \pm 0,09

Diese Ergebnisse lassen auf eine präzisere und robustere TMT-Quantifizierung mit der Hilfe von ESI MS schließen. Die geringeren Standardabweichungen der ESI MS Daten können möglicherweise dadurch erklärt werden, dass für die Auswertung aufgrund einer höheren Anzahl von PSMs grundsätzlich mehr quantitative Werte vorlagen. Beispielsweise wurden für die Berechnung des geometrischen Mittels und der Standardabweichung des Reporterionenverhältnisses 127/126 im Experiment „Glu-C Bibliothek + ADAM10“ für ESI MS 593 PSMs und für MALDI MS ausschließlich 204 PSMs berücksichtigt. Insgesamt wurden in diesem Experiment mithilfe von ESI MS 121 und mithilfe von MALDI MS 81 Spaltstellen identifiziert (Abb. 13B, S. 49). Damit wurden für die Berechnung der quantitativen Daten durchschnittlich 4,9 PSMs pro Peptid für ESI MS Analysen und ausschließlich 2,5 PSMs pro Peptid für MALDI MS Analysen einbezogen. Die höchsten Standardabweichungen für beide analytischen Plattformen wurden im Experiment mit der Lys-C Peptidbibliothek und ADAM10 beobachtet. Hier wurden die wenigsten Spaltstellen identifiziert; dementsprechend lagen vergleichsweise wenige quantitative Werte zur Berechnung der geometrischen Mittel und der Standardabweichungen vor. Im selben Experiment fällt außerdem auf, dass die geometrischen Mittel der Reporterionenverhältnisse größer als die in den anderen Experimenten sind. Der Durchschnitt aus den geometrischen Mitteln 127/126, 128/126, 129/126, 130/126 sowie 131/126 beträgt in diesem Experiment bei den MALDI MS Daten 1,21 und bei den

ESI MS Daten 1,11. Dies könnte für einen systematischen Fehler in Zusammenhang mit der mit dem TMT-6plex-Reagenz 126 derivatisierten Probe, wie beispielsweise einen Pipettierfehler, sprechen.

Zusammenfassend war es mithilfe der TMT-6plex-Strategie möglich, die Reproduzierbarkeit der durch ADAM10 und ADAM17 verursachten proteolytischen Vorgänge zu demonstrieren. Dabei lieferte die ESI MS gegenüber der MALDI MS eine etwas genauere Quantifizierung. Durch die Verwendung von zwei komplementären Technologien der Massenspektrometrie konnte die Anzahl an identifizierten Spaltstellen jedoch signifikant erhöht und damit einhergehend die Qualität der Ergebnisse im Hinblick auf die Zuordnung von Spaltspezifitäten deutlich verbessert werden.

5.4 Ausblick

In der vorhergehend beschriebenen Studie wurde die Q-PICS Methode zur Bestimmung der Spaltspezifität der physiologisch sowie pathologisch relevanten Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 angewendet. Hierfür wurden in einem optimierten Protokoll zwei verschiedene proteombasierte Peptidbibliotheken mit blockierten primären Aminen vorbereitet, mit den beiden rekombinant hergestellten *Target* Proteasen in jeweils sechs Replikaten inkubiert, neu entstandene N-Termini mit TMT-6plex derivatisiert und die Proben zu gleichen Teilen vereinigt. Um die Zuordnung von falsch-positiven Spaltstellen zu unterbinden, wurden außerdem Kontrollen der Peptidbibliotheken implementiert. Zur massenspektrometrischen Analyse wurden eine LC-MALDI MS sowie eine LC-ESI MS Plattform verwendet, wodurch die Anzahl identifizierter Spaltstellen erhöht und damit einhergehend die Verlässlichkeit der Ergebnisse verbessert werden konnte.

Alternativ könnten Kontrollen von Peptidbibliotheken innerhalb eines TMT-6plex-Experimentes durchgeführt werden. Beispielsweise könnten drei Replikate der Peptidbibliotheken und drei Replikate eines *Target* Protease Experimentes mit den TMT-6plex-Reagenzien 126 bis 131 derivatisiert und simultan mittels LC-MS analysiert werden. Auf Kosten der maximal möglichen Replikate der *Target* Protease Reaktion könnten auf diese Weise zusätzliche MS Messungen eingespart und falsch-positive Spaltstellen direkt anhand der Reporterionenverhältnisse aussortiert werden.

Bezogen auf ADAM10/17 wurde ein direkter Vergleich der Spaltspezifität der beiden Proteasen innerhalb eines TMT-6plex-Experimentes ausgeschlossen, da die spezifischen Aktivitäten (U/mg) der rekombinant hergestellten Proteasen nicht bekannt waren.

Grundsätzlich könnte die quantitative Dimension der Q-PICS Strategie auf vielfältige Fragestellungen bezüglich einer *Target* Protease und verschiedenen Reaktionsbedingungen angewendet werden. Auf diese Weise könnte beispielsweise der Einfluss von unterschiedlichen pH-Werten, Puffern, Temperaturen oder die Wirkung von Inhibitoren auf die Spaltspezifität oder proteolytische Aktivität untersucht werden.

Im Zusammenhang mit Caspasen wurde festgestellt, dass eine Serin-Phosphorylierungsstelle in der Nähe einer potentiellen Spaltstelle im Allgemeinen inhibierend wirkt [151]. Eine Q-PICS Analyse des Einflusses von posttranslationalen Modifikationen auf die proteasekatalysierte Reaktion wäre grundsätzlich möglich, aber würde sich im Detail etwas komplizierter gestalten. Beispielsweise müsste zur Untersuchung von Phosphorylierungen zunächst eine entsprechende Peptidbibliothek, möglicherweise mit der Hilfe von Proteinkinase A, hergestellt, Phosphopeptide aufgereinigt und im Hinblick auf die Position der Phosphorylierungsstellen genau charakterisiert werden. Innerhalb eines TMT-6plex-Experimentes müsste die *Target* Protease anschließend in drei Replikaten mit der dephosphorylierten Bibliothek (z. B. durch die Behandlung mit Alkaliner Phosphatase) und in drei Replikaten mit der phosphorylierten Bibliothek inkubiert werden. Im Anschluss an die *Target* Protease Reaktion müsste auch die Phosphopeptidbibliothek dephosphoryliert werden, um das isobare Prinzip des TMT-6plex-Experimentes zu gewährleisten. In der Konsequenz werden Phosphorylierungsstellen nicht massenspektrometrisch erfasst, was für das Gelingen der Strategie eine möglichst genaue Charakterisierung der Phosphopeptidbibliothek zu Beginn des Experimentes voraussetzt.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Q-PICS Strategie ist die zeitaufgelöste Analyse proteolytischer Reaktionen. Bei drei relevanten Zeitpunkten könnten zwei Replikate der *Target* Protease Reaktion zum Zeitpunkt t_1 , zwei Replikate zum Zeitpunkt t_2 sowie zwei Replikate zum Endzeitpunkt t_{Ende} innerhalb eines TMT-6plex-Experimentes miteinander verglichen werden. Die Strategie könnte in weiteren TMT-6plex-Experimenten beliebig um zusätzliche Zeitpunkte ergänzt werden, jedoch sollte jeweils der Endzeitpunkt t_{Ende} als Referenz verwendet werden. Auf diese Weise könnte zum einen das Entstehen oder der Abbau von Spaltprodukten beobachtet werden und zum anderen potentiell

bevorzugte Aminosäuren der *non-prime* und *prime* Sequenzen identifiziert werden. Der Abbau von ursprünglich in der Peptidbibliothek enthaltenen Peptiden könnte jedoch nicht beobachtet werden, da hier keine freien und damit mit TMT-6plex derivatisierbaren N-Termini vorliegen würden. Ein weiteres Hindernis könnte die Geschwindigkeit einer proteasekatalysierten Reaktion auf Peptidebene darstellen. Diese müsste beispielsweise durch Variation der Enzymmenge so eingestellt werden, dass eine Probenabnahme zu relevanten Zeitpunkten möglich wäre.

Zur Bestimmung der Spaltspezifität von ADAM10 und ADAM17 wurden zwei komplementäre Technologien der Massenspektrometrie, MALDI und ESI MS, verwendet. Der damit verbundene Mehraufwand ist künftig vor allem in dem Fall zu empfehlen, wenn aufgrund niedriger Proteaseaktivität gegenüber von Peptiden nur wenige Spaltvorgänge erwartet werden, wie es bei den hier untersuchten *Target* Proteasen der Fall war.

Der Q-PICS Ansatz [74] basiert auf der vorangegangenen und ausschließlich qualitativ ausgelegten PICS Strategie [69]. Dabei werden durch die *Target* Protease generierte N-Termini biotinyliert und anschließend angereichert. Dieser Schritt entfällt bei Q-PICS aufgrund der Derivatisierung mit TMT-6plex-Reagenzien. Die Verwendung von stabilisotopenmarkierten Biotin-Derivaten anstelle von TMT-6plex-Reagenzien würde, im Sinne von Q-PICS, eine quantitative Dimension eröffnen und gleichzeitig die in PICS implementierte Anreicherung von proteasegenerierten N-Termini zur Steigerung der Sensitivität in der nachfolgenden MS Analyse ermöglichen. Die Quantifizierung würde hierbei im Gegensatz zum originalen TMT-basierten Q-PICS auf der Ebene von MS1-Spektren stattfinden.

Die Spaltspezifitätsprofile von ADAM10 und ADAM17 könnten künftig verwendet werden, um die Positionen von Spaltstellen in bekannten Substraten der beiden Proteasen einzuschätzen. Auf ähnliche Weise wurde bei der Bestimmung der ADAM10/17 Spaltstelle in Klotho verfahren [142]. Jedoch werden aufgrund der vergleichsweise breiten Spaltspezifität dringend zusätzliche Experimente zur exakten Lokalisierung einer Spaltstelle empfohlen. Hier könnte beispielsweise die *Top-down* Massenspektrometrie behilflich sein.

Darüber hinaus könnten die bekannten Spaltspezifitäten zur Planung von Genmutationsexperimenten verwendet werden. Durch Austausch- oder Deletionsverfahren könnte beispielsweise die Hydrolyse bekannter Substrate durch ADAM10/17 verhindert

und nachfolgend die damit verbundenen physiologischen Auswirkungen näher untersucht werden.

Häufig wird ein Spaltprodukt identifiziert bevor die für die Hydrolyse verantwortliche Protease zugeordnet werden kann, wie es beispielsweise bei den ADAM17 Spaltprodukten TNF- α oder sIL-6R der Fall war. Auch bei dieser Problemstellung können Spaltspezifitätsprofile grundsätzlich hilfreich sein, da anhand typischer Spaltsequenzen für verschiedene Proteasen die Anzahl möglicher Kandidaten für die gesuchte Protease eingeschränkt werden kann.

Die mithilfe von Q-PICS ermittelten Daten könnten außerdem zur Entwicklung spezifischer Inhibitoren für ADAM10/17 herangezogen werden. Dabei handelt es sich beispielsweise um peptidähnliche Verbindungen, sogenannte Peptidmimetika, die zusätzlich eine zinkkomplexierende funktionelle Gruppe, wie eine Hydroxamsäurefunktion, enthalten.

Bezüglich den verwendeten rekombinant hergestellten ADAMs, welche lediglich aus der Prodomäne und katalytischen Domäne der Metalloproteasen bestanden, wäre es interessant den Einfluss der bekanntlich inhibierenden Prodomäne auf die proteolytische Aktivität zu überprüfen. Dafür müsste die katalytische Domäne entweder ohne die Prodomäne exprimiert werden, wodurch jedoch deren Chaperon-Funktion verloren gehen würde, oder die Prodomäne müsste nachträglich beispielsweise durch eine Behandlung mit Furin enzymatisch abgespalten werden. Jedoch müssten anschließend Furin und die ADAM Prodomäne aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden. Die proteolytische Aktivität der beiden Präparationen könnte beispielsweise anhand der Hydrolyserate von verschiedenen fluorogenen Substraten verglichen werden.

Die Spaltspezifität von ADAM10 und ADAM17 könnte außerdem erneut in Anwesenheit aller *in vivo* vorhandenen Domänen (Abb. 6, S. 23) und der Zellmembran bestimmt werden, um der physiologischen Situation ein Stück näher zu kommen. Dafür könnten proteombasierte Peptidbibliotheken möglicherweise mit Zellen, in denen ADAM10/17 überexprimiert wurde, inkubiert werden. Um die durch die *Target* Proteasen katalysierten Spaltvorgänge von denen anderer an der Oberfläche lokalisierter oder ins Zellmedium sezernierter Proteasen unterscheiden zu können, müsste jedoch ein zusätzliches Kontrollexperiment mit Wildtyp-Zellen durchgeführt werden. Dies könnte jedoch innerhalb eines TMT-6plex-Experimentes erfolgen.

6 Von *Top-down* zu *Bottom-up*: Zeitaufgelöste Analyse proteolytischer Reaktionen

6.1 Einleitung

6.1.1 Zeitaufgelöste Analyse proteolytischer Reaktionen

Eines der meistverfolgten Ziele der Degradomik, im Anschluss an die Identifizierung eines Protease-Substrat-Paares, ist die Lokalisierung von zugehörigen Spaltstellen in der Aminosäuresequenz. Ist eine Protease für die Hydrolyse von mehr als einer Peptidbindung in einem betreffenden Substrat verantwortlich, so stellt sich die Frage nach bevorzugten Spaltstellen und damit einhergehend nach intermediär auftretenden Spaltprodukten, welche grundsätzlich von biologischer Bedeutung sein können. Um ein vollständigeres Bild einer proteasekatalysierten Reaktion zu erhalten, sollte diese in der Konsequenz über mehrere Zeitpunkte hinweg beobachtet werden.

Einige vorhergehende Studien befassten sich mit der zeitabhängigen Untersuchung proteolytischer Reaktionen vor dem Hintergrund hoch komplexer Proben. Beispielsweise wurde die Proteolyse von humanem Granzym B in Jurkat Zelllysaten zu drei verschiedenen Zeitpunkten analysiert [152]. Hiefür wurde SILAC [81] und die bereits beschriebene N-terminale COFRADIC Methode (S. 17) [76–78] verwendet. Auf der Basis von Jurkat Zellen wurde außerdem die proteolytische Aktivität von verschiedenen Caspasen mithilfe einer SRM (*Selected Reaction Monitoring*) Methode für etwa 1.000 Peptide zu mehreren Zeitpunkten untersucht [153]. Caspase-generierte N-Termini wurden vor der LC-MS Analyse durch Subtiligase biotinyliert und nach tryptischem Verdau angereichert (S. 16) [75]. Mithilfe von iTRAQ-TAILS (S. 16) [90] wurde die Proteolyse von MMP-10 im Sekretom von Fibroblasten zeitabhängig untersucht [154]. Auf diese Weise wurde unter anderem die Hydrolyse bekannter Substrate durch MMP-10 validiert sowie neue Substratkandidaten der Protease identifiziert. Ein Großteil der heute verfügbaren Methoden erfordert, durch die Implementierung diverser chemischer Derivatisierungsstrategien sowie Anreicherungsprotokolle zur Reduktion der Probenkomplexität, eine zeitaufwändige und fehler-anfällige Probenvorbereitung. Nach der Inkubation von Proteinen mit der relevanten Protease wird außerdem eine zweite, von der *Target* Protease unabhängige *Work* Protease, meist Trypsin, eingesetzt. Damit findet die abschließende LC-MS Analyse im Sinne einer *Bottom-up* Strategie auf der Ebene von

Peptiden statt. Damit geht nicht nur die Information über den proteolytischen Abbau des intakten Substrates verloren, sondern auch das gleichzeitige Wissen um den N- und C-Terminus eines Spaltproduktes. Eine *Top-down* Analyse der proteasekatalysierten Reaktion ohne den Einsatz einer *Work* Protease könnte viele der vorhergehend aufgezählten methodischen Nachteile umgehen. Insbesondere intakte Substrate mit einem Molekulargewicht von bis zu etwa 25 kDa [155] können routinemäßig analysiert werden.

In der vorliegenden Studie sollte eine LC-MS Methode zur zeitaufgelösten Analyse einer proteasekatalysierten Reaktion basierend auf der Hydrolyse von einem Substrat etabliert werden. Diese sollte die gleichzeitige Erfassung des intakten Substrates sowie von Spaltprodukten höheren, mittleren und niedrigeren Molekulargewichtes ermöglichen.

6.1.2 Das Modellsystem – Pepsin und Lysozym

Die im Magensaft enthaltene Aspartatprotease Pepsin ist für den Abbau von Nahrungsproteinen unter sauren Bedingungen verantwortlich. Im Anschluss an den Verdau im Magen gelangen die proteolytischen Spaltprodukte in den Dünndarm und werden bei neutralem bis alkalischem pH-Wert weiter von den Pankreasproteasen (z. B. Trypsin oder Chymotrypsin) hydrolysiert.

Bei C-Typ Lysozym handelt es sich grundsätzlich um ein antimikrobielles Enzym, welches von verschiedenen Organismen und Gewebetypen produziert wird und in diversen biologischen Flüssigkeiten (z. B. humane Milch, Speichel oder Tränen) vorkommt [156]. Die antimikrobielle Wirkung von Lysozym beruht zum einen auf der Hydrolyse der Peptidoglykanschicht von vornehmlich Gram-positiven Bakterien. Außerdem wurde beschrieben, dass das Protein antimikrobielle Peptidsequenzen enthält [157–159]. Große Mengen des Proteins können aus dem Hühnereiweiß isoliert werden. C-Typ Lysozym aus Hühnereiweiß (LYZ; UniProt, P00698) besteht, nach Entfernung des Signalpeptides, aus 129 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von etwa 14,3 kDa. Die Struktur des Proteins wird durch vier Disulfidbrücken stabilisiert. LYZ zählt neben Ovalbumin, Ovomuroid und Ovotransferrin zu den hauptverantwortlichen Allergenen in Hühnereiweiß. Vor allem Kinder leiden an allergischen Reaktionen, die durch die Aufnahme der beschriebenen Hühnereiweißproteine ausgelöst werden [160]. Jedoch verschwindet die Allergie in den meisten Fällen

mit zunehmendem Alter. Dies könnte unter anderem darin begründet sein, dass der pH-Wert des Magensaftes in den ersten Lebensjahren von etwa 4 auf 2 abnimmt [158]. Damit steigt die Aktivität von Pepsin und sinkt in der Konsequenz die Wahrscheinlichkeit, dass das intakte Allergen oder große proteolytische Spaltprodukte die Darmschleimhaut erreichen. Entsprechend wird eine Sensibilisierung des Immunsystems bzw. eine Bindung von IgE-Antikörpern, die hauptsächlich für das Auslösen allergischer Reaktionen verantwortlich ist, verhindert.

Grundsätzlich stellt die Nachahmung von den im Magen vorherrschenden physiologischen Bedingungen eine Herausforderung dar. Neben dem pH-Wert spielt das Enzym-Substrat-Verhältnis eine Rolle, welches nicht nur von der sezernierten Menge Pepsin, aber auch von der Menge an aufgenommenem Nahrungsprotein abhängig ist. In vorangegangenen Studien wurden unter anderem Enzym-Substrat-Verhältnisse (w/w) von 19:1 [161] oder 1:20 [162] berichtet. Weitere einflussreiche Parameter sind die insgesamt Verweildauer des Nahrungsbreis im Magen oder die gleichzeitige Anwesenheit weiterer Nahrungsmittelbestandteile, wie beispielsweise die Präsenz des Phospholipides Phosphatidylcholin [163]. Auch verschiedene Verfahren während der Zubereitung von Lebensmitteln, wie die Behandlung mit Hitze [164,165], können die Verdaubarkeit von Proteinen gegenüber Pepsin verändern.

Das physiologisch relevante Protease-Substrat-Paar von Pepsin und LYZ wurde zur Etablierung einer zeitaufgelösten kombinierten *Top-down* und *Bottom-up* LC-MS Strategie untersucht. Der Verdau wurde zum einen bei pH 2 (Modell Erwachsener) und zum anderen bei pH 4 (Modell Kleinkind) durchgeführt. Relevante Proben für die LC-MS Messung wurden mithilfe einer Tricin-SDS-PAGE Analyse identifiziert. Außerdem wurde der Einfluss von Disulfidbrücken als PTMs auf den peptischen Verdau analysiert.

Es soll betont werden, dass in dieser Studie die Entwicklung einer analytischen Strategie, und nicht die möglichst detailgetreue Nachahmung der im Magen vorherrschenden physiologischen Bedingungen, im Vordergrund stand.

6.2 Material und Methoden

6.2.1 Chemikalien

Acetonitril	≥ 99,9%, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Acrylamid-Bis Lösung	30%, 29:1, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
APS	Sigma-Aldrich
β-Lactoglobulin	<i>Bos taurus</i> , Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Carboanhydrase	<i>Bos taurus</i> , Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue G	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue R	Sigma-Aldrich
Cytochrom C	<i>Equus caballus</i> , Sigma-Aldrich
Insulin	<i>Bos taurus</i> , Sigma-Aldrich
Katalase	<i>Bos taurus</i> , Sigma-Aldrich
Essigsäure	Sigma-Aldrich
FA	98%, Sigma-Aldrich
Glycerin	≥ 99%, Sigma-Aldrich
LYZ	<i>Gallus gallus</i> , L6876, Sigma-Aldrich
Methanol	≥ 99,6%, Sigma-Aldrich
MilliQ-Wasser	18,2 MΩ/cm, vorbereitet mit dem arium611 System, Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Monellin	<i>Dioscoreophyllum cumminsii</i> , Sigma-Aldrich
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich
NaCl	Sigma-Aldrich
Pepsin	<i>Sus scrofa</i> , P6887, 4220 U/mg, Sigma-Aldrich
HCl	37%, Sigma-Aldrich
SDS	Carl Roth
Peptid 1931	Synthetisches Peptid, KLVNRRSEFSALTPASR, Biosyntan (Berlin, Deutschland)
TEMED	99%, Carl Roth
TFA	99%, Sigma-Aldrich
TRIS	Carl Roth
TRIS-HCl	Carl Roth

Tricin

Carl Roth

6.2.2 Optimierung der LC-Säulenkombination

Zur Trennung der Analyten sollte eine monolithische Trennsäule (ProSwift RP-4H, 100 µm i.D. x 25 cm, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland) an einem UltiMate 3000 nano-LC-System (Dionex, Idstein, Deutschland) verwendet werden, für die keine Vorsäule mit identischer stationärer Phase kommerziell erhältlich war. Deswegen wurden drei verschiedene, eine monolithische (PepSwift, 200 µm i.D. x 5 mm, Thermo Fisher Scientific) und zwei partikuläre (Acclaim PepMap C4, 300 µm i.D. x 5 mm, 5 µm, 300 Å; Acclaim PepMap C8, 300 µm i.D. x 5 mm, 5 µm, 100 Å; beide Thermo Fisher Scientific), Vorsäulen in Kombination mit der Trennsäule anhand einer Fünf-Komponentenmischung getestet. Diese bestand bei einer Konzentration von 0,05 mg/ml zu gleichen Teilen (w/w) aus Peptid 1931, Insulin, Cytochrom C, Lysozym und β -Lactoglobulin (gelöst in 0,1% TFA). Außerdem lagen die einzelnen Komponenten der Mischung zu einer Konzentration von 0,01 mg/ml gelöst in 0,1% TFA vor. Von der Fünf-Komponentenmischung wurden pro Säulenkombination jeweils dreimal 75 ng und von den Einzelkomponenten jeweils einmal 15 ng injiziert. Der Einfluss der Temperatur auf die Trennung der Analyten wurde bei allen Säulenkombinationen für 35 und 60 °C im Säulenofen untersucht.

Table 5: Gradient aus den Eluenten A (0,05% TFA) und B (80% ACN/0,04% TFA) zur Trennung der Fünf-Komponentenmischung bzw. der Einzelkomponenten bei einer Flussrate von 500 nl/min und einer Säulenofentemperatur von 35 bzw. 60 °C.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	95	5
4	95	5
4,1	80	20
30	20	80
31	0	100
47	0	100
48	95	5
60	95	5

Nach Injektion wurden die Analyten zunächst mit 3% ACN/0,1% TFA für 4 min auf der Vorsäule konzentriert und entsalzt. Dabei betrug die Flussrate für die monolithische Vorsäule 15 µl/min und für die C4 bzw. C8 Vorsäule 30 µl/min. Anschließend wurden die Analyten durch einen Gradienten aus den Eluenten A (0,05% TFA) und B (80%

ACN/0,04% TFA) bei einem Fluss von 500 nl/min auf der monolithischen Trennsäule getrennt (Tabelle 5). Die UV-Spur wurde bei 214 nm detektiert.

6.2.3 Verdau von Lysozym mit Pepsin

LYZ wurde zu einer Konzentration von 2 mg/ml in 30 mM NaCl gelöst. Ein Aliquot wurde nachfolgend mit 1 M HCl auf pH 2,0 eingestellt, ein zweites mit 0,1 M HCl auf pH 4,0. Die pH-Werte wurden mithilfe einer Mikro-pH-Elektrode (InLab Micro Pro, Mettler Toledo, Columbus, USA) überprüft. Pepsin wurde zu 1,2 mg/ml in 30 mM NaCl Lösung gelöst, die vorher entweder mit 1 M HCl auf pH 2,0 oder mit 0,1 M HCl auf pH 4,0 eingestellt wurde. Anschließend wurde Pepsin des entsprechenden pH-Wertes zu den LYZ Lösungen von pH 2 bzw. 4 gegeben (Enzym-Protein-Verhältnis, 1:5, w/w; 844 U/mg) und die Proben bei 37 °C inkubiert. Nach 1 min, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 24 h wurden jeweils 160 µl aus dem Reaktionsansatz entnommen und zu 75 µl 160 mM Natriumcarbonat-Lösung (pH 12,0) gegeben, wodurch eine irreversible Inaktivierung der proteolytischen Aktivität von Pepsin beabsichtigt wurde. Parallel wurden Kontrollen von LYZ und Pepsin bei pH 2 und 4 unter den identischen Bedingungen inkubiert, nach 1 min und 24 h wurden 160 µl aus dem Reaktionsansatz entnommen und entsprechend mit 160 mM Natriumcarbonat-Lösung versetzt.

6.2.4 Tricin-SDS-PAGE

Tricin-SDS-PAGE Analysen unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen der in Kapitel 6.2.3 beschriebenen Proben wurden nach einem publizierten Protokoll [166,167] durchgeführt, wobei die Apparaturen und das Zubehör des Mini-PROTEAN Tetra Cell Paketes (Bio-Rad, Hercules, USA) verwendet wurden. Trenngele (16% T) und Sammelgele (4% T) wurden selbst gegossen (Tabelle 6A). Ein geeigneter Proteinmassenstandard wurde selbst hergestellt und enthielt die folgenden Komponenten: Peptid 1931 (2 kDa), Monellin (6 kDa), LYZ (14 kDa), β -Lactoglobulin (18 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und Katalase (60 kDa). Das Peptid bzw. die Proteine wurden dafür einzeln zu 1 mg/ml in 25 mM ABC (pH 6,8) gelöst und anschließend zu gleichen Teilen (v/v) vereinigt. Zur Probenvorbereitung wurden 10 µl der Proben (10 µg LYZ und 2 µg Pepsin), LYZ-Kontrollen (10 µg LYZ) oder der Pepsin-Kontrollen (2 µg Pepsin) durch Vakuumkonzentration auf etwa 5 µl eingengt. Anschließend wurden die Proben 1:1 (v/v) mit 5 µl nicht-reduzierendem oder reduzierendem Probenpuffer (Tabelle 6B)

versetzt, für 15 min bei 70 °C inkubiert, anschließend auf Eis gekühlt und in die Taschen des Sammelgels überführt. Vom Proteinmassenstandard wurden ohne vorhergehende Vakuumkonzentration 5 µl (5 µg Peptid/Protein) mit 5 µl nicht-reduzierendem bzw. reduzierendem Probenpuffer versetzt. Anschließend wurde unter den identischen Bedingungen inkubiert und der Proteinmassenstandard in die Taschen überführt.

Tabelle 6: Rezepturen Tricin-SDS-PAGE. (A) Zusammensetzung der verwendeten Sammel- und Trenngele. Die angegebene Rezeptur reicht für etwa sechs Gele des Formates 8,3 x 7,3 x 0,1 cm aus. (B) Zusammensetzung des verwendeten nicht-reduzierenden bzw. reduzierenden Probenpuffers. Das ausschließlich im reduzierenden Probenpuffer enthaltene β-Mercaptoethanol ist durch den Asteriskus gekennzeichnet.

A			B
Komponente	Zusammensetzung	Zusammensetzung	Zusammensetzung Probenpuffer
	Sammelgel (4% T)	Trenngel (16% T)	
30% Acrylamid-Bis Lösung (29:1)	1,32 ml	16,00 ml	100 mM TRIS-HCl (pH 6,8)
Gelpuffer (2,5 M TRIS-HCl, pH 8,8)	1,52 ml	12,90 ml	1% (w/v) SDS
MilliQ-Wasser	6,84 ml	0,66 ml	0,02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G
10% (w/v) APS	100 µl	100 µl	24% (w/v) Glycerin
TEMED	10 µl	18 µl	4% (v/v) β-Mercaptoethanol*
Gesamtvolumen	etwa 10 ml	etwa 30 ml	

Der pH-Wert des Laufpuffers (25 mM TRIS, 25 mM Tricin, 0,5% (w/v) SDS) wurde laut Protokoll nicht eingestellt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 125 V durchgeführt, wobei die Laufzeit etwa 3 h betrug. Die Peptide/Proteine wurden nachfolgend für etwa 30 min in 50% Methanol/10% Essigsäure im Gel fixiert, die Gele für circa 2 h in 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R (gelöst in 10% Essigsäure) gefärbt und über Nacht mit 10% Essigsäure entfärbt, wobei sie kontinuierlich geschwenkt wurden (Rocking Platform, VWR, Radnor, USA). Nach dem Entfärben wurden die Gele eingescannt (biostep, ViewPix900, EPSON, Suwa, Japan).

6.2.5 LC-ESI LTQ Orbitrap MS

Basierend auf den durch Tricin-SDS-PAGE erhaltenen Ergebnissen wurden alle acht Zeitpunkte des Verdauens von LYZ mit Pepsin bei pH 2 zur nachfolgenden Analyse mittels LC-MS ausgewählt. Die Proben wurden vor und nach der Reduktion von Disulfidbrücken analysiert, um die Analyse disulfidverbrückter Peptide zu erleichtern. Nicht-reduzierte Proben wurden zu 0,01 mg/ml mit 0,01% TFA verdünnt. Disulfidbrücken wurden in Anwesenheit von 25 mM TCEP (gelöst in 50 mM ABC, pH 7,0) für 1 h bei 37 °C reduziert und die Proben anschließend mit 0,25% TFA zu 0,01 mg/ml verdünnt.

Die LC-MS Analysen wurden an einem UltiMate 3000 nano-LC-System (Dionex), welches *online* an ein LTQ Orbitrap Velos Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) gekoppelt war, durchgeführt. Nicht-reduzierte Proben wurden jeweils einmal injiziert, reduzierte Proben wurden doppelt gemessen. Die Injektionsmenge betrug jeweils 25 ng LYZ. Die Temperatur des Säulenofens betrug 60 °C. Die Proben wurden zunächst auf einer C8 Vorsäule (siehe Kapitel 6.2.2, S. 61) für 4 min bei einer Flussrate von 30 µl/min mit 3% ACN/0,1% TFA konzentriert und entsalzt. Anschließend wurden die Analyten auf einer monolithischen Trennsäule (siehe Kapitel 6.2.2, S. 61) durch einen Gradienten aus den Eluenten A (0,05% FA) und B (80% ACN/0,04% FA) bei einer Flussrate von 500 nl/min separiert (Tabelle 7). Die UV-Spur wurde bei 214 nm detektiert.

Tabelle 7: Gradient aus den Eluenten A (0,05% FA) und B (80% ACN/0,04% FA) zur Trennung des Probengemisches bei einer Flussrate von 500 nl/min und einer Säulentemperatur von 60 °C.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	95	5
4	95	5
4,1	90	10
45	30	70
46	5	95
56	5	95
57	95	5
70	95	5

Das Massenspektrometer war mit den Programmen LTQ Tune Plus (Version 2.7.0) und XCalibur (Version 2.2, beide Thermo Fisher Scientific) ausgestattet. Im *Tune File* wurden für die Aufnahme von MS und MSⁿ Spektren jeweils zwei *Microscans* und eine maximale Injektionszeit von 1.000 ms definiert. Daten wurden von 4 bis 70 min aufgezeichnet. MS *Full Scans* wurden im Orbitrap Massenanalysator in einem Massenbereich von 500 bis 2.000 *m/z* bei der maximal möglichen Auflösung von 100.000 erfasst. Nachfolgend wurden die drei intensivsten Ionen mit einem minimalen Ladungszustand von *z*=2 zur HCD Fragmentierung (NCE, 35%; Isolationsfenster, 3 *m/z*; Aktivierungszeit, 0,1 ms) ausgewählt. Ionen, deren Ladungszustände nicht automatisch zugeordnet werden konnten, wurden nicht von der Analyse ausgeschlossen. Die Fragmentionen wurden im Orbitrap Massenanalysator bei einer Auflösung von 60.000 registriert. Außerdem wurde ein dynamisches Ausschlussverfahren (*Dynamic Exclusion*) zur Auswahl der Vorläuferionen mit einer Massentoleranz von 10 ppm und den folgenden Einstellungen verwendet: Anzahl der wiederholten Fragmentierung, 2; Wiederholungszeitfenster,

30 s; Ausschlussdauer, 180 s. Nachdem in den reduzierten Proben des Verdau von LYZ mit Pepsin bei pH 2,0 einfach positiv geladene Ionen mit teilweise hoher Intensität beobachtet werden konnten, wurden die Zeitpunkte 2 h und 24 h ergänzend ohne den Ausschluss dieser Ionen von der HCD Fragmentierung analysiert.

6.2.6 Auswertung der Daten

Die LC-MS Rohdaten aller Proben wurden getrennt voneinander der Software Proteome Discoverer (Version 1.4, Thermo Fisher Scientific) und dem Suchalgorithmus SEQUEST zur Identifizierung der Peptide zugeführt. In den nicht-reduzierten Proben sollten auf diese Weise Peptide ohne Disulfidbrücken identifiziert werden. Die verwendete FASTA-Datenbank bestand aus 2.263 Proteinsequenzen: den geprüften kanonischen Sequenzen des Hühnerproteoms (*Gallus gallus*, UniProt, heruntergeladen am 15.01.2015) und der Sequenz von Pepsin (*Sus scrofa*). Es wurde keine Enzymspezifität angegeben. Die Massentoleranz der Vorläuferionen wurde auf 10 ppm gesetzt, die der Fragmentionen auf 0,02 Da. Es wurde keine feste und eine variable Modifikation (Oxidation, Met) verwendet. Ausschließlich Peptide, welche mit mindestens drei PSMs von hoher Sicherheit der richtigen Zuordnung (1% FDR) und Suchmaschinen-Rang 1 identifiziert wurden, wurden in die nachfolgende Datenauswertung einbezogen.

Die abundantesten Signale der nicht-reduzierten Proben wurden manuell durch die Auswertung der HCD-Spektren identifiziert, wobei unterstützend die Daten der reduzierten Proben einbezogen wurden.

Um die Entwicklung der Signalintensitäten der einzelnen identifizierten Proteolyseprodukte zu beobachten, wurde die jeweils maximale Intensität der Isotopenverteilung für jeden Zeitpunkt des Experimentes protokolliert. Dabei wurde über alle Zeitpunkte derselbe Ladungszustand, dessen Signale in der Regel am intensivsten waren, für ein bestimmtes Peptid betrachtet. Die Signalintensitäten der doppelt mittels LC-MS gemessenen reduzierten Proben wurden gemittelt. Aus den Daten wurden relative Signalintensitäten berechnet und die daraus folgenden Ergebnisse als *Heatmaps* durch bedingte Formatierung in Excel (Version 2007, Microsoft, Redmond, USA) dargestellt.

6.3 Ergebnisse und Diskussion

6.3.1 Analytische Strategie

Zur Analyse des proteasekatalysierten Abbaus eines Substrates über mehrere Zeitpunkte hinweg wurde eine Strategie verwendet, bei der zwei analytische Plattformen aufeinanderfolgend eingesetzt werden: Tricin-SDS-PAGE und LC-MS (Abb. 14).

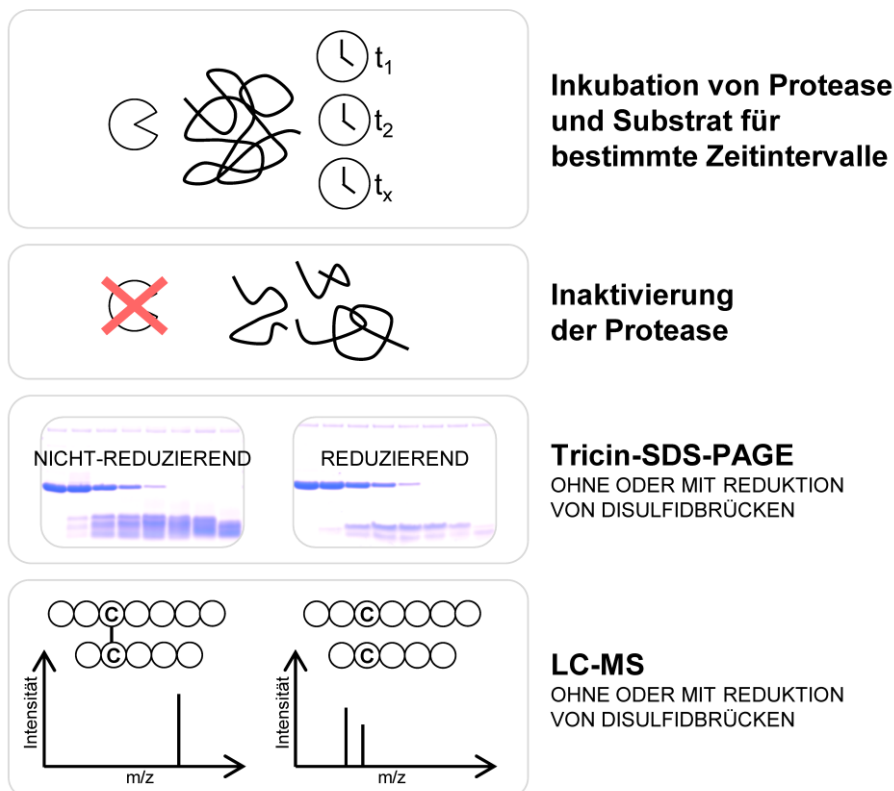


Abb. 14: Analytische Strategie. Das Protease-Substrat-Paar wird bei definierten Reaktionsbedingungen inkubiert. Nach der Probenabnahme zu bestimmten Zeitpunkten wird die Protease irreversibel inaktiviert. Um einen ersten Überblick über die proteolytischen Vorgänge zu erhalten, werden die Proben bei nicht-reduzierenden bzw. reduzierenden Bedingungen mittels Tricin-SDS-PAGE untersucht. Proben von relevanten Zeitpunkten werden im Anschluss, ohne und mit vorhergehender Reduktion von Disulfidbrücken, mittels LC-MS analysiert.

Zunächst werden die *Target* Protease und das zugehörige Substrat bei den interessierenden Reaktionsbedingungen miteinander inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wird ein Teil der Probe aus dem Reaktionsansatz entnommen und die Protease irreversibel inaktiviert. Anschließend wird eine Tricin-SDS-PAGE Analyse aller Zeitpunkte durchgeführt. Im Vergleich zur klassischen Glycin-SDS-PAGE/Laemmli-SDS-PAGE erlaubt diese elektrophoretische Trennmethode eine bessere Auflösung von Proteinen, die kleiner als 30 kDa sind [168,169]. Peptide bis zu einem Molekulargewicht von etwa 1 kDa können

auf diese Weise getrennt und detektiert werden. Mithilfe von Tricin-SDS-PAGE Analysen kann folglich zum einen der Grad des Substratabbaus durch die Protease und zum anderen die Größe der Spaltprodukte vergleichsweise schnell und einfach eingeschätzt werden. Außerdem können anhand der Ergebnisse diejenigen Proben, in denen keine Proteolyse des Substrates stattgefunden hat, von der nachfolgenden LC-MS Analyse ausgeschlossen werden. Dies reduziert nicht nur den Arbeitsaufwand, sondern auch die Messzeit. Die präsentierte LC-MS Strategie erlaubt die gleichzeitige Untersuchung des intakten Substrates sowie intermediär auftretender und am Ende der Proteolyse vorliegender Spaltprodukte. Folglich können simultan Analyten von höherem, mittlerem sowie kleinerem Molekulargewicht erfasst werden.

Die Methode wurde auf Pepsin und LYZ angewendet, welche angelehnt an die im Magen vorherrschenden Bedingungen eines Erwachsenen bei pH 2 bzw. eines Kleinkindes bei pH 4 miteinander inkubiert wurden. Im Anschluss an die Probenabnahme wurde Pepsin irreversibel inaktiviert, indem ein pH-Wert von über 8 eingestellt wurde [170]. Tricin-SDS-PAGE und LC-MS Analysen wurden jeweils ohne und mit der vorherigen Reduktion von Disulfidbrücken durchgeführt.

Ein großer Vorteil der hier dargestellten Strategie ist, dass weder das Substrat noch die Spaltprodukte chemisch derivatisiert werden. Außerdem wird keine *Work* Protease eingesetzt, da auch das intakte Substrat und größere Spaltprodukte mit der LC-MS Plattform analysiert werden können. Hinzu kommt, dass der Einsatz einer LC Vorsäule bei geringer Komplexität der Probenmatrix grundsätzlich zur Aufreinigung der Analyten für die MS Analyse ausreicht. In der Konsequenz müssen keine zusätzlichen Schritte, die meist mit Probenverlusten einhergehen, unternommen werden.

6.3.2 Optimierung der LC-Säulenkombination

Bevor die mittels Tricin-SDS-PAGE bzw. LC-MS erhaltenen Ergebnisse für Pepsin und LYZ erläutert und diskutiert werden, soll auf eine methodische Optimierung im Hinblick auf die zur nano-LC Trennung verwendete Säulenkombination eingegangen werden.

Die simultane chromatographische Trennung von kleineren, mittleren und größeren Spaltprodukten sowie dem intakten Substrat setzt die Verwendung einer geeigneten stationären Phase voraus. Da für monolithische Säulen eine herausragende Trennleistung sowohl für Peptide [171] als auch Proteine [172] beschrieben wurde, fiel die Wahl auf eine Trennsäule mit einem Ethylvinylbenzol/Divinylbenzol-Copolymer.

Außerdem wurde, wie bereits erwähnt, eine Vorsäule eingesetzt, um zusätzliche Aufreinigungsschritte in der Probenvorbereitung einzusparen. Eine Vorsäule mit dem identischen stationären Material und Vernetzungsgrad der Trennsäule war jedoch nicht kommerziell erhältlich. Deshalb wurden drei andersartige Vorsäulen in Kombination mit der monolithischen Trennsäule mittels LC-UV getestet: (i) eine monolithische Vorsäule mit höherem Vernetzungsgrad des Ethylvinylbenzol/Divinylbenzol-Copolymers, (ii) eine C4 und (iii) eine C8 Vorsäule. Hierfür wurde eine Fünf-Komponentenmischung, die zu gleichen Teilen (w/w) aus Peptid 1931 (2 kDa), Insulin (6 kDa), Cytochrom C (12 kDa), LYZ (14 kDa) und β -Lactoglobulin (18 kDa) bestand, verwendet. Die Analyten wurden bei jeder Säulenkombination zunächst für einige Minuten auf der Vorsäule konzentriert und entsalzt und anschließend bei identischem Gradienten auf die Trennsäule eluiert. Die Trennung wurde jeweils bei einer Säulenofentemperatur von 35 und 60 °C durchgeführt.

Die übereinandergelegten Chromatogramme von jeweils drei technischen Replikaten der LC-UV Analyse der Fünf-Komponentenmischung zeigen eine hohe Reproduzierbarkeit für alle drei Säulenkombinationen sowohl bei einer Temperatur von 35 als auch 60 °C (Abb. 15).

Unter Verwendung der C8 Vorsäule (35 °C, 29 s; 60 °C, 25 s) wurden grundsätzlich größere durchschnittliche Peakhalbwertsbreiten beobachtet als unter Verwendung der monolithischen (35 °C, 23 s; 60 °C, 22 s) oder der C4 (35 °C, 21 s; 60 °C, 21 s) Vorsäule. Dieser Unterschied ist vor allem darin begründet, dass die Elutionsdauer von Peptid 1931 bei diesen beiden Vorsäulen kürzer als die der vier Proteinkomponenten war. Grundsätzlich verschieben sich die Retentionszeiten der fünf Analyten von der monolithischen (Abb. 15A, B) über die C4 (Abb. 15C, D) bis hin zur C8 (Abb. 15E, F) Vorsäule zu späteren Zeitpunkten. Das Chromatogramm der Trennung unter Verwendung der monolithischen Vorsäule zeigt bei 60 °C (Abb. 15B) im Vergleich zu dem bei 35 °C (Abb. 15A) eine stark reduzierte Intensität des Peptid-Peaks. Diese Beobachtung spricht zusammen mit der früheren Elution der Analyten für eine geringere Retention der Probenkomponenten, insbesondere des Peptides 1931 bei einer Temperatur von 60 °C, durch die monolithische Vorsäule. Die Verwendung dieser Vorsäule könnte in der Folge zu starken Verlusten von Analyten mit niedrigerem Molekulargewicht, wie sie unter anderem bei der Proteolyse von LYZ durch Pepsin erwartet wurden, führen.

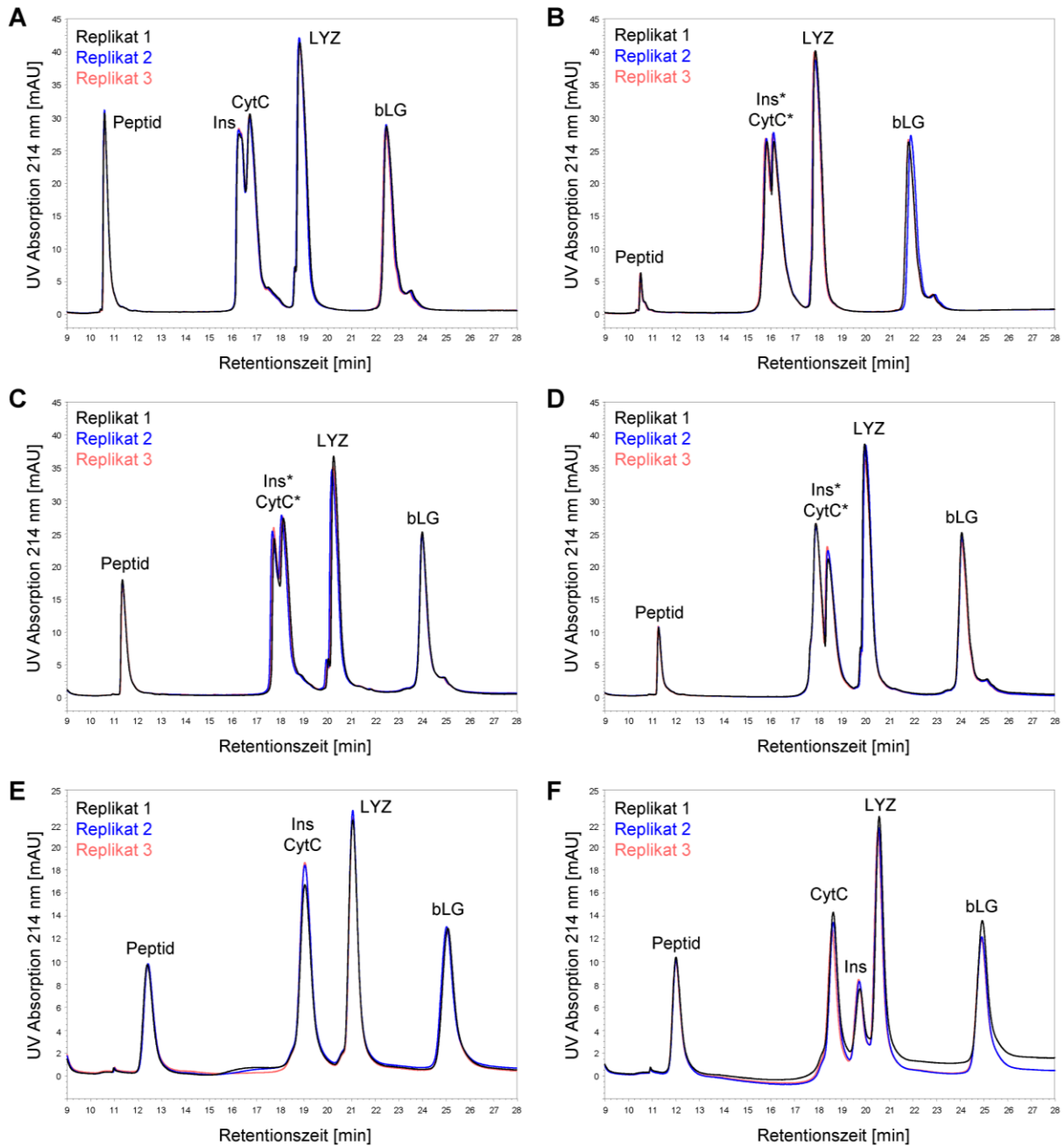


Abb. 15: Übereinandergelegte Chromatogramme von drei Replikaten einer LC-UV Analyse (214 nm). Die Probe bestand zu gleichen Teilen (w/w) aus Peptid 1931 (Peptid), Insulin (Ins), Cytochrom C (CytC), LYZ und β -Lactoglobulin (bLG). Zur Trennung wurden eine monolithische (A, B), eine C4 (C, D) oder eine C8 (E, F) Vorsäule in Kombination mit einer monolithischen Trennsäule verwendet. Die Temperatur des Säulenofens betrug dabei 35 °C (A, C, E) bzw. 60 °C (B, D, F). Der Asteriskus kennzeichnet, dass die Zuordnung von Insulin bzw. Cytochrom C zu einem Peak in diesen Fällen nicht möglich war.

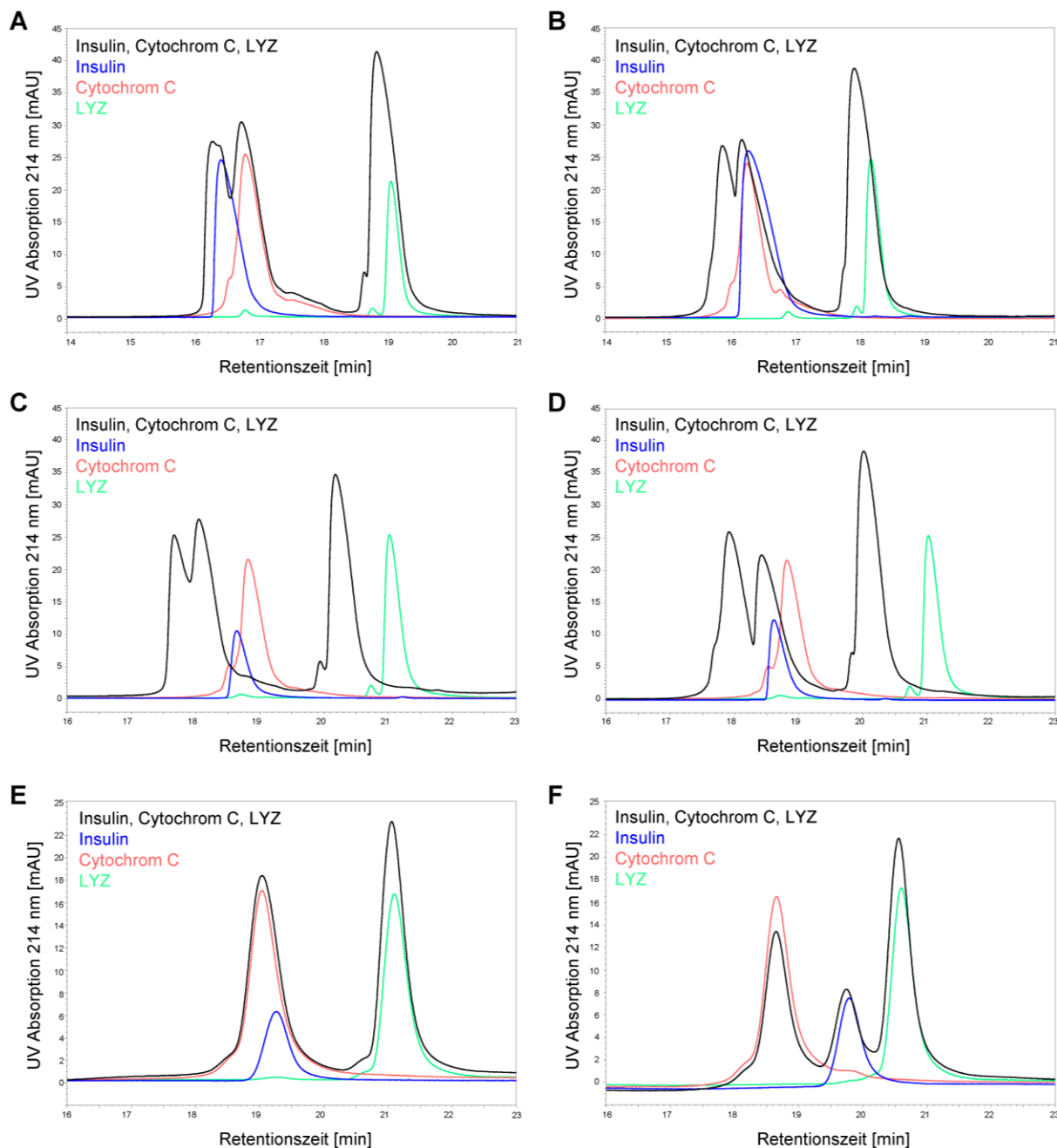


Abb. 16: Übereinandergelegte Chromatogramme von LC-UV Analysen (214 nm). Chromatogramme aus Abb. 15 wurden schwarz dargestellt (Ausschnitt von Insulin, Cytochrom C und LYZ). Chromatogramme einzeln injizierter Komponenten wurden blau (Insulin), rot (Cytochrom C) und grün (LYZ) gekennzeichnet. Zur Trennung wurden eine monolithische (A, B), eine C4 (C, D) oder eine C8 (E, F) Vorsäule in Kombination mit einer monolithischen Trennsäule verwendet. Die Temperatur des Säulenofens betrug dabei 35 °C (A, C, E) bzw. 60 °C (B, D, F).

Die beste Auflösung der fünf Komponenten wurde mithilfe der C8 Vorsäule bei 60 °C erzielt (Abb. 15F), wohingegen bei 35 °C (Abb. 15E) aufgrund der Koelution von Insulin und Cytochrom C ausschließlich vier Peaks zu erkennen waren. Unter Verwendung der monolithischen und der C4 Vorsäule (Abb. 15A-D) wurden jeweils fünf Komponenten detektiert, wobei Insulin und Cytochrom C jedoch als Doppelpeak auftraten. Grundsätzlich ist bekannt, dass höhere Temperaturen die Trennung von Proteinen begünstigen [173].

Die Identität der Analyten wurde in der LC-UV Analyse anhand von Einzelinjektionen der fünf Komponenten aufgeklärt. Dabei fiel auf, dass die durch die Injektion der Fünf-Komponentenmischung und die durch die Injektion der einzelnen Komponenten erhaltenen Retentionszeiten im Fall der monolithischen (bei 60 °C) (Abb. 16B) und der C4 (Abb. 16C, D) Vorsäule nicht übereinstimmen. Damit konnte in den entsprechenden Fällen aufgrund der bloßen UV-Detektion keine sichere Zuordnung von Insulin und Cytochrom C (Ins*, CytC*, Abb. 15B-D) zu den Peaks des Chromatogrammes erfolgen. In der Fünf-Komponentenmischung scheinen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Analyten die Retentionszeiten gegenüber denen der Einzelkomponenten zu beeinflussen [174]. Diese Beobachtung stellt sich im Hinblick auf die zeitaufgelöste Untersuchung proteasekatalysierter Reaktionen als problematisch dar, da sich die Probenzusammensetzung theoretisch zu jedem Zeitpunkt der Analyse ändert. Für die C8 Vorsäule wurde diese Abhängigkeit der Retentionszeiten von der Probenzusammensetzung nicht beobachtet (Abb. 16E, F).

Chromatogramme der LC-UV Analyse unter Verwendung der C8 Vorsäule zeigen symmetrische Peakformen (Abb. 16E, F), wohingegen bei der monolithischen und C4 Vorsäule *Tailing* Effekte sichtbar sind.

Zusammenfassend fiel die Wahl aufgrund der Überlegenheit in verschiedenen Aspekten und auch im Hinblick auf die im Pepsin-Verdau von LYZ zu erwartenden Analyten auf die C8 Vorsäule in Kombination mit der monolithischen Trennsäule. Die chromatographische Trennung sollte bei einer Temperatur von 60 °C erfolgen.

6.3.3 Tricin-SDS-PAGE Analyse des Pepsin-Verdaus von Lysozym

Um einen ersten Überblick über das Ausmaß der Pepsin-katalysierten Hydrolyse von LYZ bei pH 2 bzw. pH 4 zu erhalten, wurden die verschiedenen Zeitpunkte mittels Tricin-SDS-PAGE analysiert (Abb. 17). Hierfür wurde eine leicht abgewandelte, vereinfachte Form [166,167] des originalen Tricin-SDS-PAGE Protokolls [168,169] verwendet.

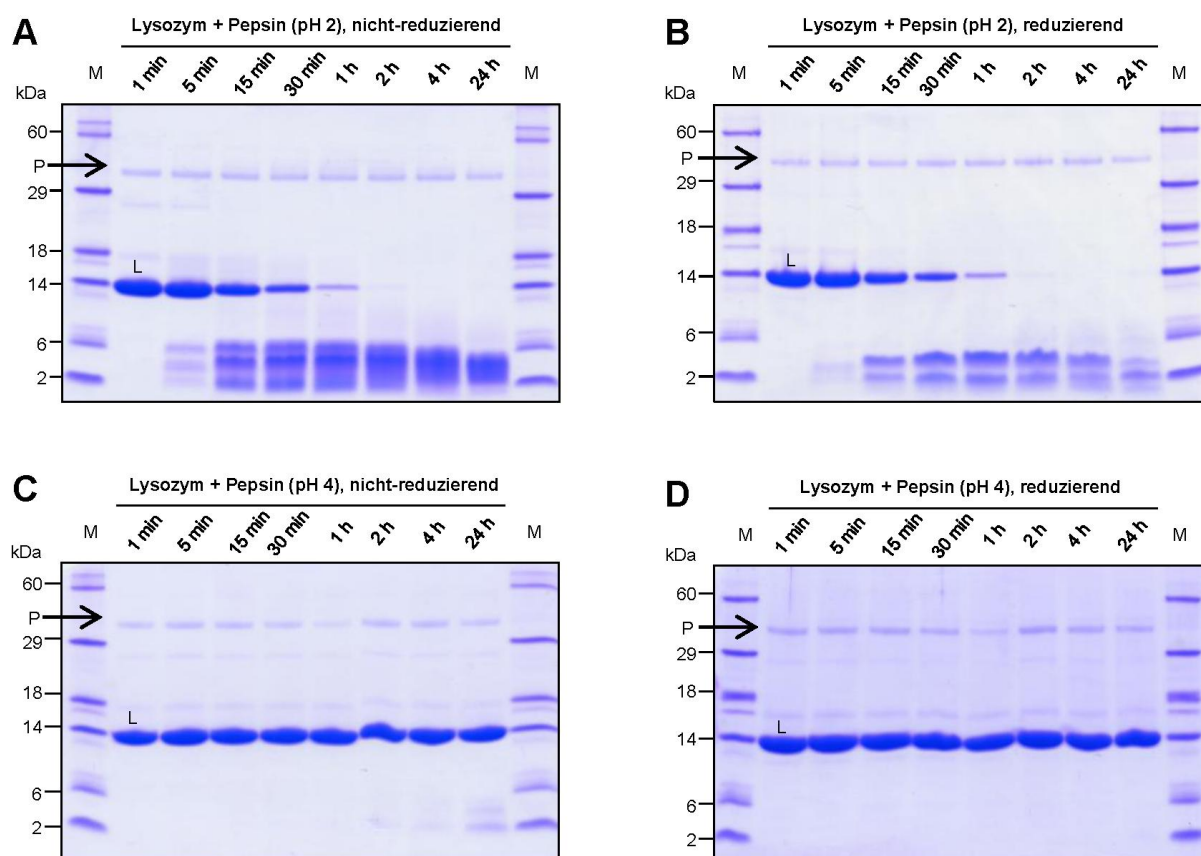


Abb. 17: Tricin-SDS-PAGE Analysen des Pepsin-Verdaus von LYZ. LYZ wurde bei pH 2 (A, B) bzw. pH 4 (C, D) mit Pepsin inkubiert (Inkubationsdauer jeweils 1 min, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 24 h). Tricin-SDS-PAGE Analysen wurden unter nicht-reduzierenden (A, C) sowie reduzierenden (B, D) Bedingungen durchgeführt. Abkürzungen: L, Lysozym; M, Proteinmassenstandard; P, Pepsin.

Nach 4 h Inkubationszeit mit Pepsin bei pH 2 konnte mittels Coomassie-Färbung kein intaktes LYZ mehr detektiert werden (Abb. 17A, B). Demgegenüber wurde bei pH 4 keine signifikante Proteolyse des Substrates festgestellt (Abb. 17C, D). Dies steht in Einklang mit der berichteten verminderten Aktivität von Pepsin bei pH 4; das pH-Optimum der Protease liegt bei einem pH-Wert von ungefähr 2 [170]. Dennoch wurde in einer vorhergehenden Studie überraschenderweise festgestellt, dass Pepsin bei einem pH-Wert von 4 antimikrobielle Peptide aus LYZ freisetzt [158]. Die Autoren übertrugen

die erhaltenen Ergebnisse des peptischen Verdaus von dem aus Hühnereiweiß isolierten LYZ auf humanes Lysozym, welches unter anderem in Muttermilch vorkommt. Es wurde vermutet, dass Säuglinge durch diesen Mechanismus vor Infektionen geschützt werden. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten konnten diese Theorie im Hinblick auf einen signifikanten Verdau von LYZ durch Pepsin bei einem pH-Wert von 4 nicht stützen. Ähnlich konnte eine kürzliche Studie [175] keine Hydrolyse von LYZ bei einem pH-Wert von 3,2 feststellen, was die Verlässlichkeit der hier vorgestellten Daten einmal mehr bestätigt.

Betrachtet man die Tricin-SDS-PAGE Trennung für pH 2 (Abb. 17A, B) genauer, so fällt grundsätzlich auf, dass das maximale Molekulargewicht der Spaltprodukte zwischen 2 und 24 h sinkt. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen (Abb. 17A) werden nach 5 min der Proteolyse drei Banden bei etwa 2, 4 und 6 kDa beobachtet, die nach 30 min zunehmend unscharf werden. Demgegenüber treten unter reduzierenden Bedingungen (Abb. 17B) zwei Banden von etwa 2 und 4 kDa auf, die bis zu einer Inkubationszeit von 24 h größtenteils definiert bleiben, wobei die Bande bei 4 kDa am Ende schwächer erscheint und eine neue Bande bei etwa 1 kDa erscheint. Es muss erwähnt werden, dass Gelanalysen generell keine genaue Bestimmung des Molekulargewichtes erlauben. Zudem verhindern die unter nicht-reduzierenden Bedingungen präsenten Disulfidbrücken eine vollständige Linearisierung der Analyten, wodurch die elektrophoretische Migration durch das Gel beeinflusst werden kann.

Tricin-SDS-PAGE Analysen der Kontrollen von LYZ und Pepsin (jeweils 1 min und 24 h inkubiert) zeigen keine Kontaminationen oder Spaltprodukte, welche durch einen Selbstverdau der Protease entstehen könnten (Anhang, Abb. A2, S. 143). Die Intensität der Bande für Pepsin nimmt nach 24 h folglich nicht ab. Dies ist bemerkenswert, da es sich grundsätzlich um eine Protease mit sehr breiter Substrat- und Spaltspezifität handelt. Jedoch läuft die autokatalytische Aktivierung des Zymogens Pepsinogen durch Pepsin unter sauren Bedingungen sehr spezifisch ab [176].

In einem unabhängigen Experiment wurde der Einfluss einer vorhergehenden Hitze-denaturierung von LYZ auf die Verdaubarkeit durch Pepsin untersucht. Dafür wurde LYZ für 10 min bei 90 °C erhitzt, bevor der pH-Wert auf pH 2 bzw. pH 4 eingestellt und die Protease zugegeben wurde. Außer einer leicht erhöhten Hydrolyserate bei pH 4, konnten keine signifikanten Unterschiede zu den Ergebnissen aus dem Pepsin-Verdau

mit unerhitztem LYZ festgestellt werden (Anhang, Abb. A3, S. 144). Folglich übt eine Hitzbehandlung bei den beschriebenen Bedingungen, beispielsweise während der Lebensmittelzubereitung, vermutlich keinen Einfluss auf die Verdaubarkeit von LYZ durch Pepsin aus. Für Ovalbumin wurde hingegen eine stark erhöhte Hydrolyserate durch Pepsin im Anschluss an eine Hitzedenaturierung bei 100 °C für 30 min gezeigt [165]. Dieser Effekt wurde nicht für Ovomuroid, einem weiteren im Hühnereiweiß enthaltenen Allergen, beobachtet.

Zusammenfassend ermöglichen Tricin-SDS-PAGE Analysen der verschiedenen Zeitpunkte auf einfache Art und Weise einen Überblick über den proteolytischen Abbau des Substrates zu erhalten. Damit kann zum einen der Grad der Proteolyse und zum anderen das Molekulargewicht der entstandenen Spaltprodukte eingeschätzt werden. Zudem können relevante Proben für die nachfolgende LC-MS Analyse ausgewählt werden. Bei einem pH-Wert von 4 wurde LYZ kaum von Pepsin prozessiert, weshalb ausschließlich die acht Zeitpunkte der Proteolyse bei pH 2 mittels LC-MS untersucht wurden.

Grundlegend können Tricin-SDS-PAGE Analysen auch in Vorexperimenten hilfreich sein, beispielsweise um geeignete Reaktionsbedingungen, wie das Enzym-Substrat-Verhältnis oder Zeitpunkte zur Probenabnahme, zu ermitteln.

6.3.4 LC-MS Analyse des Pepsin-Verdaus von Lysozym

Alle acht Zeitpunkte des Pepsin-Verdaus von LYZ bei pH 2 wurden mittels hochauflösender LC-ESI LTQ Orbitrap MS analysiert. Zur chromatographischen Trennung, sowohl des intakten Substrates als auch der aus der Proteolyse resultierenden Spaltprodukte, wurden eine C8 Vorsäule und eine monolithische Trennsäule verwendet (Kapitel 6.3.2, S. 67). Da es sich bei LYZ mit einem Molekulargewicht von 14,3 kDa um ein vergleichsweise kleines Protein handelt, war es nicht notwendig weitere die *Top-down* Analyse unterstützende Vorkehrungen zu treffen. Hier wäre beispielhaft die Verwendung ladungsreduzierender Reagenzien [177,178] zu nennen.

LYZ wurde vor der Inkubation mit Pepsin nicht reduziert, um den Einfluss der vier Disulfidbrücken im Substrat auf den Verdau mit der Protease nicht zu vernachlässigen. Die LC-MS Analyse wurde jedoch sowohl auf der Basis von nicht-reduzierten als auch von reduzierten, aber nicht alkylierten Analyten durchgeführt. Die LC-MS Messung von reduzierten Spaltprodukten sollte die manuelle Auswertung der MS²-Spektren nicht-reduzierter Proben unterstützen.

In der reduzierten Probenreihe wurden insgesamt 86 Spaltprodukte zwischen 738 Da (²³YSLGNW²⁸) und 9.277 Da (¹KVFGR...PCSAL⁸³) identifiziert, welche die Sequenz von LYZ vollständig abdecken (Abb. 18). Die Anzahl der einmaligen Spaltstellen beläuft sich auf 43 (Anhang, Abb. A4A, S. 145), wobei an der P1 Position hauptsächlich Alanin (19%), gefolgt von Asparagin, Glycin und Leucin beobachtet wurde (Anhang, Abb. A4B, S. 145). An der P1' Position wurde eher Alanin (19%), gefolgt von Tryptophan, Asparagin, Serin und Valin festgestellt. In der MEROPS Datenbank [35] sind über 400 Spaltstellen für Pepsin aufgelistet (Stand: 24.02.2015). Demnach zieht die Protease an der P1 Position Phenylalanin (21%) und Leucin (16%) vor, während an der P1' Position eher Leucin (12%), Alanin (12%) und Valin (10%) auftreten (Anhang, Abb. A4C, S. 145). Beide Datensätze spiegeln die breite Spaltspezifität von Pepsin wider.

Es kann davon ausgegangen werden, dass aufgrund der breiten Spaltspezifität von Pepsin noch mehr Spaltprodukte während des Pepsin-Verdaus von LYZ entstanden sind. Diese wurden möglicherweise aufgrund niedriger Abundanz nicht identifiziert oder fielen bei der MS Messung unterhalb die untere Massengrenze von 500 *m/z* und wurden in der Folge nicht detektiert.

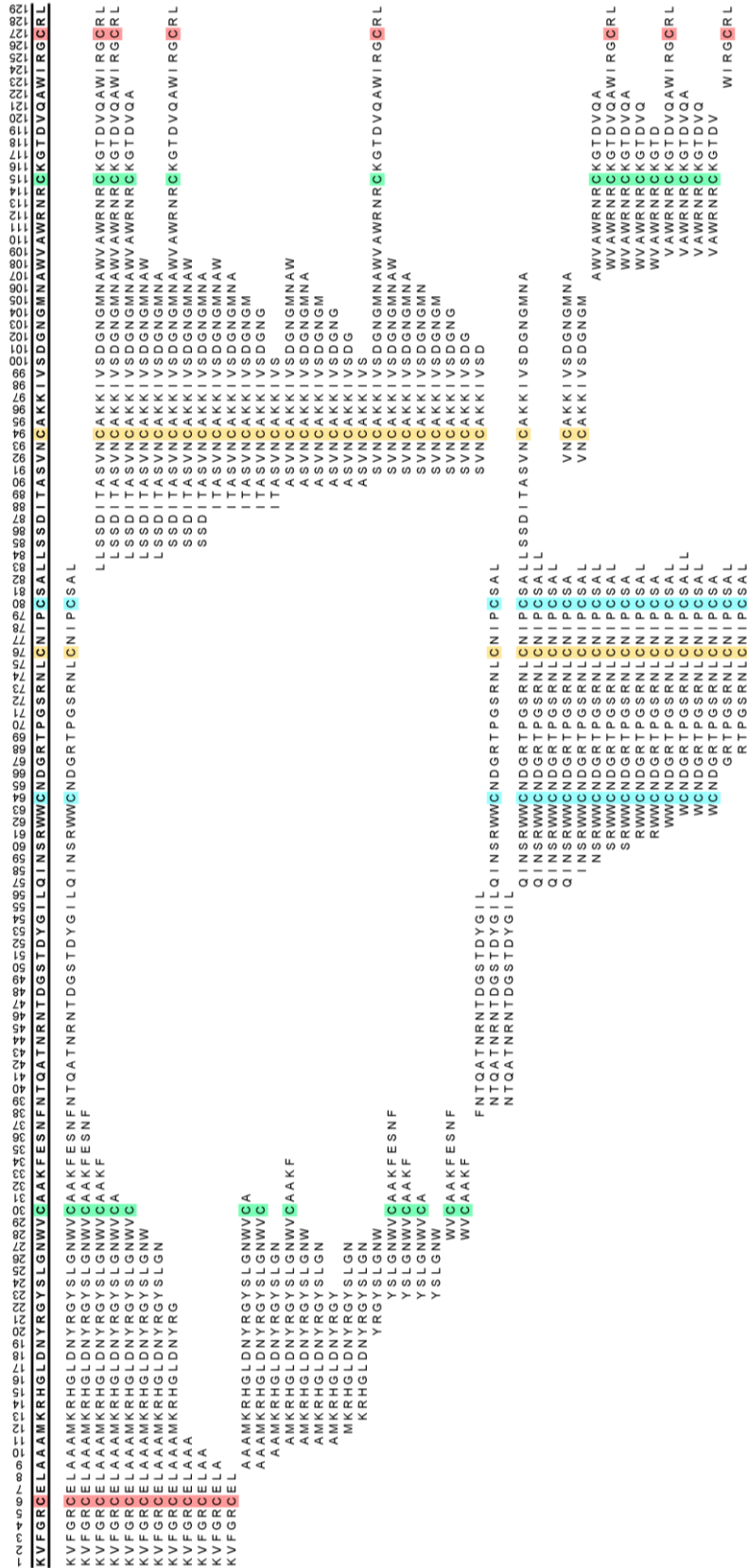


Abb. 18: Übersicht identifizierter Spaltprodukte im reduzierten Probensatz des Pepsin-Verdau von LYZ bei pH 2. Die Daten aller Zeitpunkte wurden kombiniert. Cysteine, die jeweils über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind, wurden in der gleichen Farbe dargestellt. Insgesamt wurden 43 einmalige Spaltstellen von Pepsin identifiziert.

Von den 86 identifizierten Spaltprodukten bzw. den zugehörigen m/z -Werten wurden für alle acht Zeitpunkte die Retentionszeiten dokumentiert. Die Standardabweichung der Retentionszeit eines Peptides betrug durchschnittlich 7 s. Dies zeigt die hohe Reproduzierbarkeit der chromatographischen Trennung, die zusammen mit einem bekannten m/z -Wert eine einfache Zuordnung identifizierter Peptide über die Zeit ermöglicht.

Um die zeitabhängige Entwicklung der einzelnen identifizierten Spaltprodukte zu veranschaulichen, wurden relative Signalintensitäten in einer *Heatmap* dargestellt (Abb. 19). Die Farbkodierung bezieht sich dabei auf die über die Zeit beobachtete maximale absolute Signalintensität eines Peptides, welche in einem Bereich zwischen 10^3 und 10^7 lag. Diese Darstellung erlaubt die Einschätzung der Konzentration von verschiedenen Spaltprodukten im Probengemisch, wodurch wiederum bevorzugte Spaltstellen im Substrat von denen geringerer Präferenz unterschieden werden können.

Die *Heatmap* veranschaulicht als zeitabhängiges Profil der proteasekatalysierten Reaktion ein frühes Auftreten großer Spaltprodukte, wie $^1\text{KVFGR...PCSAL}^{83}$ (9.277 Da) oder $^{57}\text{QINSR...NGMNA}^{107}$ (5.437 Da), welche innerhalb kurzer Zeit zu kleineren Spaltprodukten abgebaut werden. Nach der Pepsin-katalysierten Hydrolyse bevorzugter Spaltstellen in LYZ setzt die Protease anschließend sequenziell Aminosäuren oder kleine Peptidbruchstücke von den N- bzw. C-Termini der Spaltprodukte frei. Dies wurde insbesondere für Spaltprodukte der N-terminalen Positionen 11, 23, 57, 63, 88, 90, 91, 108 und 109 beobachtet.

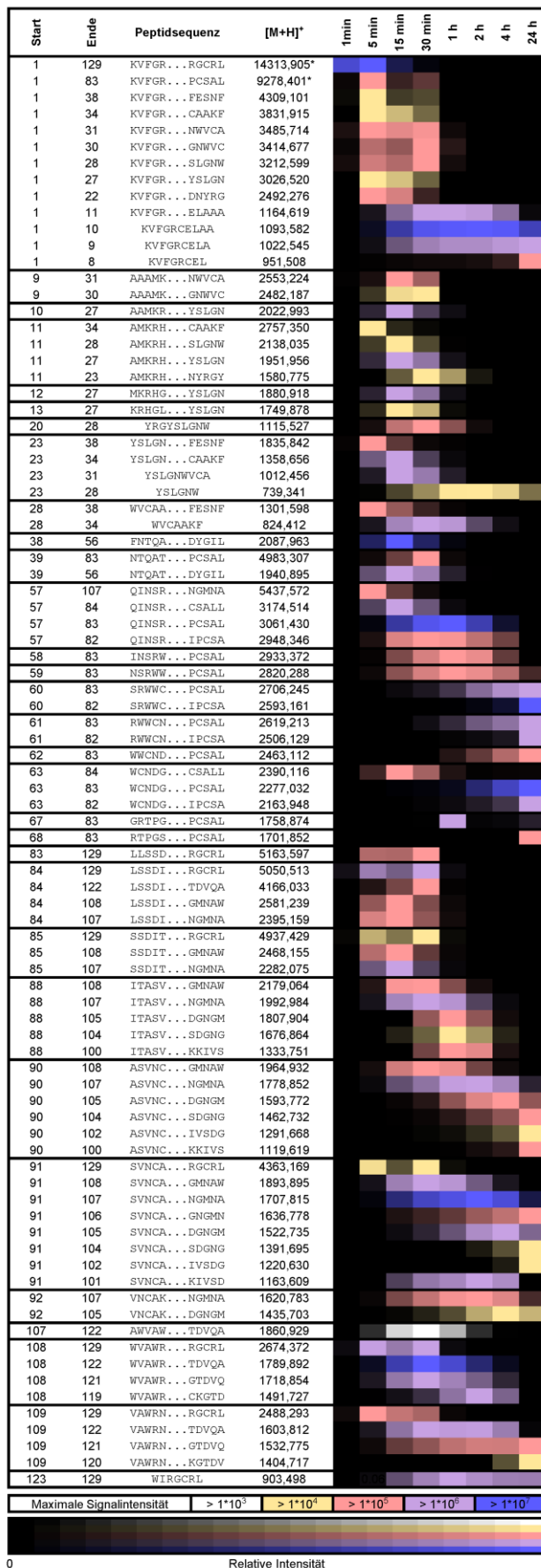


Abb. 19: Legende auf der nächsten Seite.

Abb. 19: Zeitabhängige Entwicklung relativer Signalintensitäten von LYZ und den im reduzierten Probensatz des Pepsin-Verdau bei pH 2 identifizierten Spaltprodukten. Die Farbkodierung bezieht sich auf die maximal beobachtete absolute Signalintensität eines Peptides über alle Zeitpunkte. Sie erlaubt eine Einschätzung, ob ein Spaltprodukt in niedriger oder hoher Konzentration im Probengemisch vorlag. $[M+H]^+$ bezieht sich auf die theoretische monoisotopische Masse. Der Asteriskus kennzeichnet $[M+H]^+$ des theoretisch intensivsten Peaks innerhalb der Isotopenverteilung, da der monoisotopische Peak bei Analyten höheren Molekulargewichtes schwer zuzuordnen ist.

Zusammen mit Strukturmodellen erlauben die in der vorliegenden Studie erhaltenen Ergebnisse einen Rückschluss auf die Lage bevorzugter Spaltstellen. Die bevorzugten Spaltstellen zwischen Leu-83 und Leu-84, Leu-84 und Ser-85 (Abb. 20A) oder auch zwischen Ala-107 und Trp-108 (Abb. 20B) befinden sich beispielsweise in den *Loop* Regionen von LYZ und sind an der Oberfläche des Substrates lokalisiert. Damit sind diese Spaltstellen für die Protease gut zugänglich. Die Methode der limitierten Proteolyse, in der die Massenspektrometrie zunehmend an Bedeutung gewinnt, dient der Untersuchung dreidimensionaler Strukturen eines Proteins [179,180]. Dabei werden vor allem Proteasen mit breiter Spaltspezifität, wie Pepsin, Subtilisin oder Thermolysin, unter kontrollierten Reaktionsbedingungen eingesetzt, um die selektive Hydrolyse einzelner Peptidbindungen zu ermöglichen.

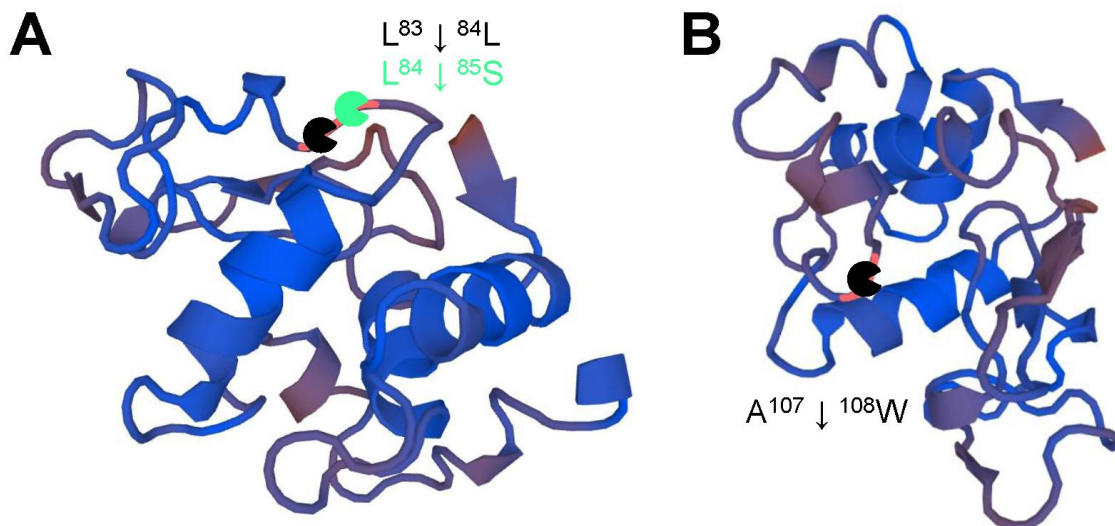


Abb. 20: Lokalisierung bevorzugter Spaltstellen. Das Strukturmodell von LYZ basiert auf der Vorlage 4wm6.1.C der SWISS-MODEL Datenbank. Peptische Spaltstellen zwischen (A) Leu-83 und Leu-84, Leu-84 und Ser-85 und zwischen (B) Ala-107 und Trp-108 befinden sich in den *Loop* Regionen des Substrates.

Wie bereits erwähnt, wurden die Proben aller acht Zeitpunkte des Verdaus von LYZ bei pH 2 auch ohne die vorherige Reduktion von Disulfidbrücken mittels LC-MS analysiert. Ein Großteil der über die Zeit beobachteten abundantesten MS1-Signale, konnte durch die manuelle Auswertung von MS2-Spektren auf disulfidverbrückte Spaltprodukte zurückgeführt werden. Dabei wurden zum einen Peptide identifiziert, die über Disulfidbrücken zwischen Cys-6 und Cys-127 (Abb. 21A) bzw. Cys-30 und Cys-115 (Abb. 21B) verknüpft sind. Zum anderen wurden Spaltprodukte zugeordnet, die gleichzeitig eine Disulfidbrücke innerhalb eines Peptides (Cys-64 und Cys-80) und eine Disulfidbrücke zwischen zwei Peptiden (Cys-76 und Cys-94) enthalten (Abb. 21C). Außerdem wurden über die Zeit intensive Signale für Spaltprodukte ohne Cysteine und folglich ohne Disulfidbrücken beobachtet (Abb. 21D). Diese Peptide wurden mithilfe von SEQUEST identifiziert. Die Entwicklung relativer Signalintensitäten über die Zeit wurde, wie bereits für den reduzierten Probensatz, in einer *Heatmap* dargestellt (Abb. 21E), wobei sich die Farbkodierung hier ausschließlich auf die Markierung der entsprechenden Disulfidbrücke bezieht.

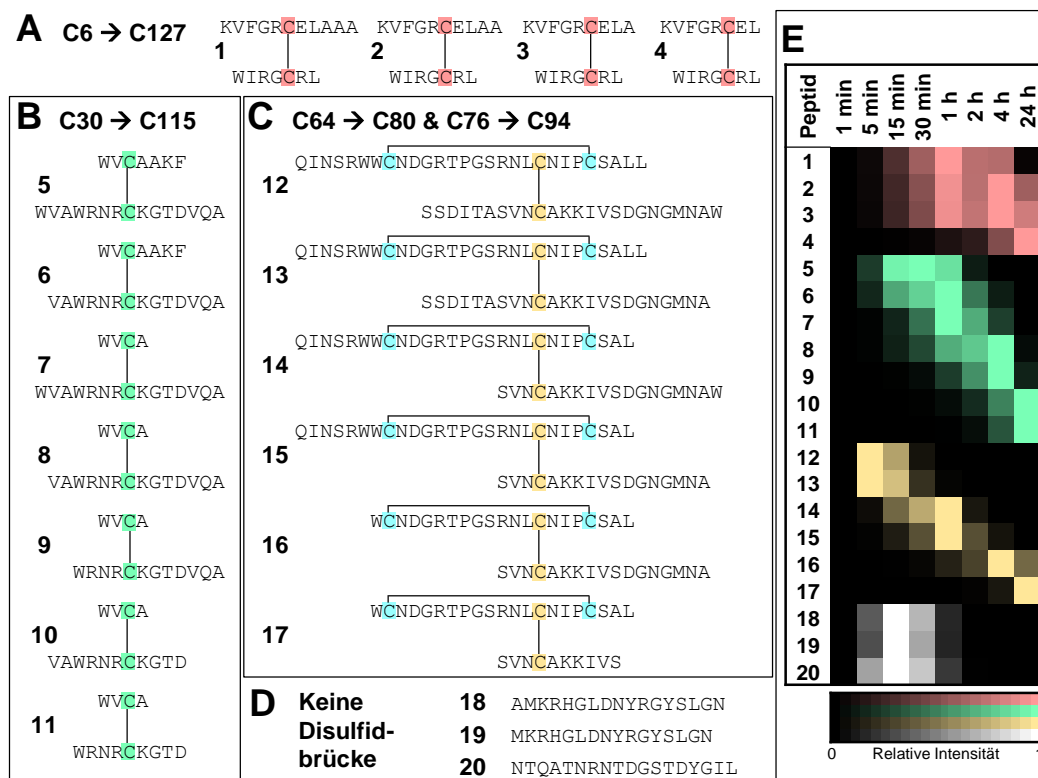


Abb. 21: Übersicht identifizierter Spaltprodukte im nicht-reduzierten Probensatz des Pepsin-Verdaus von LYZ bei pH 2. Peptide, die über Disulfidbrücke (A) C6 → C127, (B) C30 → C115 und (C) C64 → C80 sowie C76 → C94 verknüpft sind. (D) Peptide, die keine Disulfidbrücke enthalten. (E) Zeitabhängige Entwicklung relativer Signalintensitäten von den Peptiden 1 bis 20. Die Farbkodierung bezieht sich auf die Farben der entsprechenden Disulfidbrücken.

Die exakten Positionen der vier Disulfidbrücken in LYZ waren bekannt (Information: UniProt). Zudem wurde die manuelle Auswertung von MS2-Spektren disulfidverbrückter Spaltprodukte durch die für den reduzierten Probensatz erhaltenen Daten erleichtert, welche einen ersten Hinweis auf mögliche Peptidkombinationen gaben. Aus der *Heatmap* der reduzierten Probenreihe (Abb. 19, S. 78) konnte außerdem abgeschätzt werden, welche Peptide an der Entstehung intensiver Signale im nicht-reduzierten Probensatz verantwortlich sein könnten. Ähnliche Retentionszeiten implizierten meist strukturelle Gemeinsamkeiten von Spaltprodukten, wie es insbesondere für die Peptide 1, 2, 3 und 4 (Abb. 21A) beobachtet wurde, die durch den sequenziellen Verlust von Alanin vom C-Terminus des Peptides $^1\text{KVFGRCLEAAA}^{11}$ charakterisiert sind. HCD-Spektren von Peptiden, die über ein und dieselbe Disulfidbrücke verbunden sind, wiesen oft Ähnlichkeiten in den Fragmentierungsmustern auf. So konnten beispielsweise die gleichen a- und b- bzw. y-Ionen im niedrigeren Massenbereich der MS2-Spektren detektiert oder charakteristische Dehydroalanin- oder Persulfidfragmentationen [181,182] beobachtet werden, wie im Fall der Spaltprodukte 10 ($^{28}\text{WVCA}^{31} \rightarrow ^{109}\text{VAWRNRCKGTD}^{119}$, Abb. 22A) und 11 ($^{28}\text{WVCA}^{31} \rightarrow ^{111}\text{WRNRCKGTD}^{119}$, Abb. 22B).

Grundsätzlich wird Pepsin für die massenspektrometrische Zuordnung von unbekanntem Disulfidbrücken empfohlen, da der saure pH-Wert den Austausch der Positionen von Disulfidbrücken, das sogenannte *Disulfide Scrambling*, verhindert [183]. Nichtsdestotrotz besitzt die Protease eine breite Spaltspezifität, wodurch die Anzahl möglicher Peptidkombinationen im Vergleich zum Verdau mit einer hoch spezifischen Protease, wie Trypsin, stark erhöht ist. Beobachtet man jedoch den Pepsin-katalysierten Abbau disulfidverbrückter Peptide, wie im Fall von LYZ, über einen längeren Zeitraum hinweg, so kann die sequenzielle Hydrolyse einiger Aminosäuren vom N- oder C-Terminus die Interpretation von Daten vereinfachen.

Insgesamt bietet die Strategie damit das Potential auch die Zuordnung von unbekanntem Disulfidbrücken zu unterstützen.

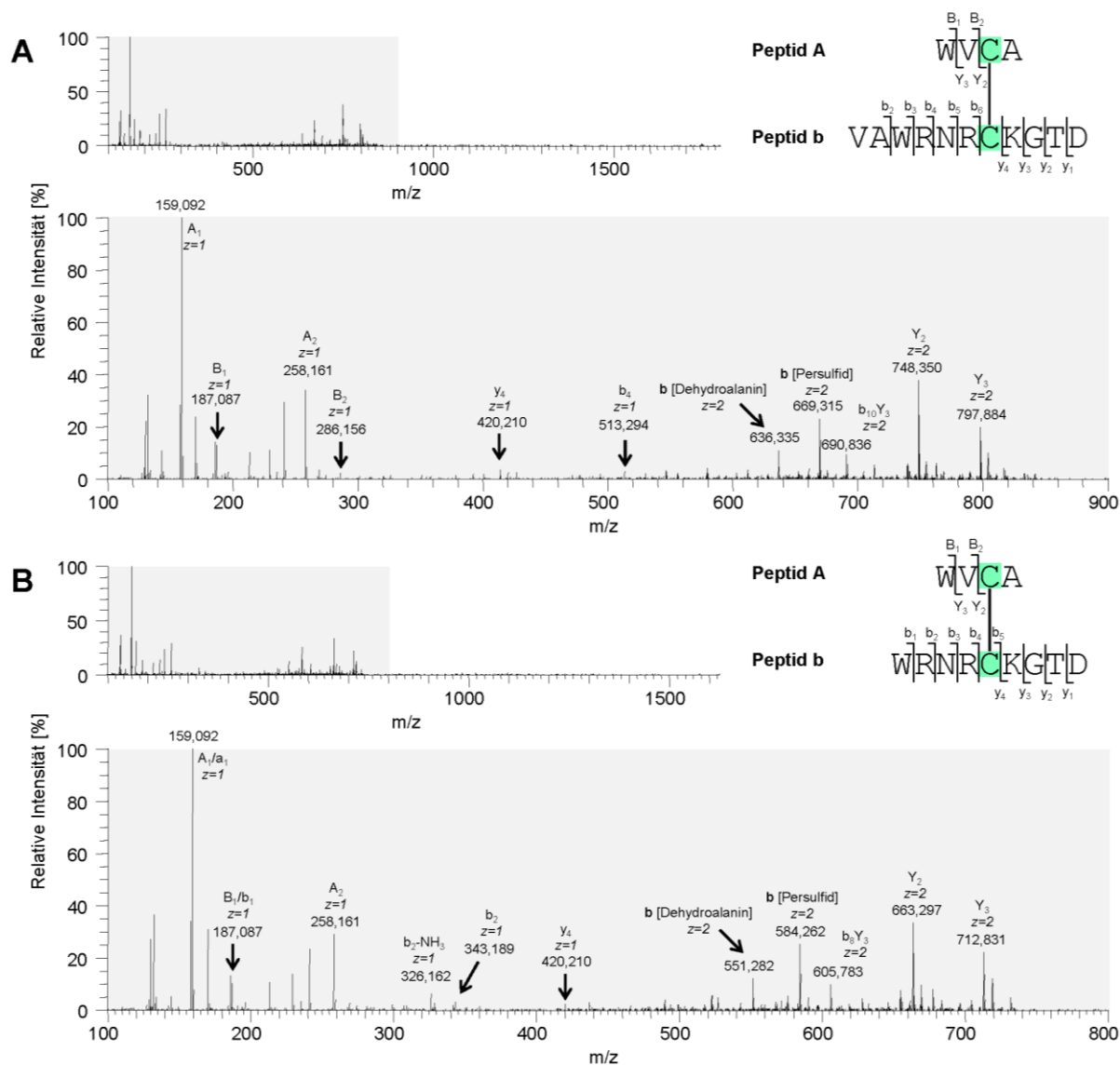


Abb. 22: MS2-Spektren von Peptiden 10 und 11 (Nummerierung bezogen auf Abb. 21B).

Überraschenderweise wurden bei den Datenbanksuchen mit SEQUEST im nicht-reduzierten Probensatz Cystein-haltige Peptide, wie 1 KVFGRCELAA¹⁰ oder 91 SVNCAKKIVSDGNGMNA¹⁰⁷, identifiziert. Diese sollten eigentlich über Disulfidbrücken mit anderen Peptiden verknüpft sein. Während eine Verschleppung von reduzierten Spaltprodukten im nano-LC-System als mögliche Ursache ausgeschlossen werden konnte, führte eine nähere Überprüfung der XICs der zugehörigen m/z -Werte zu einer interessanten Beobachtung. Die oben benannten Peptide traten künstlich, mit vergleichsweise geringer Intensität während der Elution ihrer disulfidverbrückten Spezies und nicht zu ihrer im reduzierten Probensatz festgestellten Retentionszeit auf (Abb. 23). Ein ähnliches Phänomen der Fragmentierung von Disulfidbrücken wurde in der MALDI MS im Zusammenhang mit dem sogenannten *In-Source Decay* beobachtet [184]. Für ESI

Ionenquellen im positiven Ionenmodus wurden vornehmlich Oxidationen von Analyten [185], aber auch Reduktionen, als elektrochemische Prozesse verzeichnet. Beispielsweise wurde kürzlich in einer *Top-down* ESI FT-ICR MS Analyse eines monoklonalen Antikörpers, wie auch in der vorliegenden Arbeit, eine Spaltung von Disulfidbrücken während der Ionisierung beobachtet [186]. Diese wurde als Resultat einer Erhöhung der Kapillarspannung festgestellt. Darüber hinaus wurde ein Einfluss des Anteils an organischem Lösungsmittel vermutet.

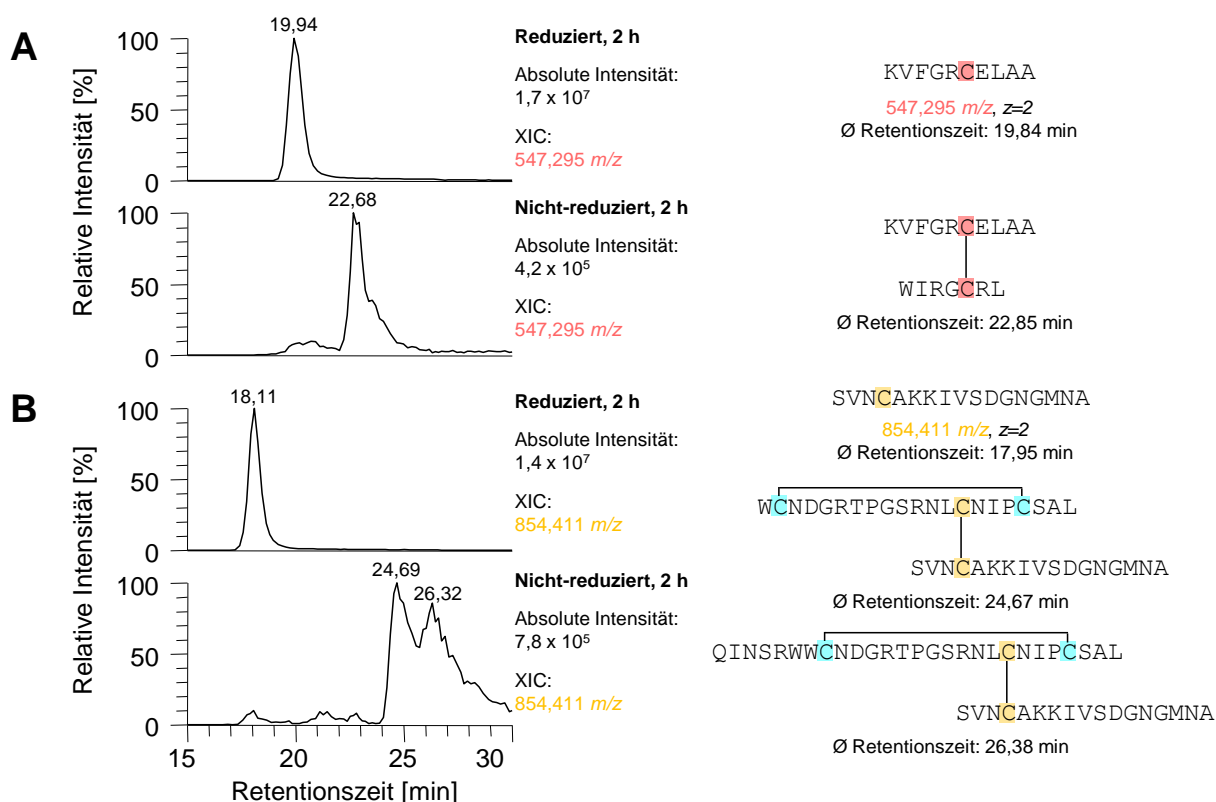


Abb. 23: Beobachteter Nebeneffekt im nicht-reduzierten Probenatz. Mithilfe von SEQUEST wurden im nicht-reduzierten Probenatz überraschenderweise die reduzierten Peptide KVFGRCELAA und SVNCAKKIVSDGNGMNA identifiziert. Der XIC der reduzierten zugehörigen m/z -Werte zeigt, dass (A) KVFGRCELAA und (B) SVNCAKKIVSDGNGMNA künstlich während der Elution ihrer disulfidverbrückten Spezies erscheinen.

Die Entwicklung des TIC über die Zeit (Abb. 24) zeigt die deutliche Abnahme bzw. Zunahme von Signalen, wie beispielsweise den vollständigen Abbau von intaktem LYZ nach 1 h (Abb. 24E) oder das Erscheinen von Peptid 11 ($^{28}\text{WVCA}^{31} \rightarrow ^{111}\text{WRNRCKGTD}^{119}$) nach 4 h (Abb. 24G) der Inkubation mit Pepsin. Anhand der *Heatmap* kann eindeutig beobachtet werden, dass große zu Beginn der Proteolyse auftretende disulfidverbrückte Spaltprodukte nach und nach von Pepsin zu kleineren Peptiden abgebaut werden (Abb. 21E, S. 80). Demgegenüber wurden die identifizierten

Cystein-freien Peptide vergleichsweise schnell durch die Protease hydrolysiert. Zudem wurden keine kleineren, aus der Hydrolyse der Peptide 18, 19 oder 20 (Abb. 21D) hervorgegangen Spaltprodukte beobachtet, was für den peptischen Verdau dieser Peptide an mehreren Spaltstellen sprechen könnte.

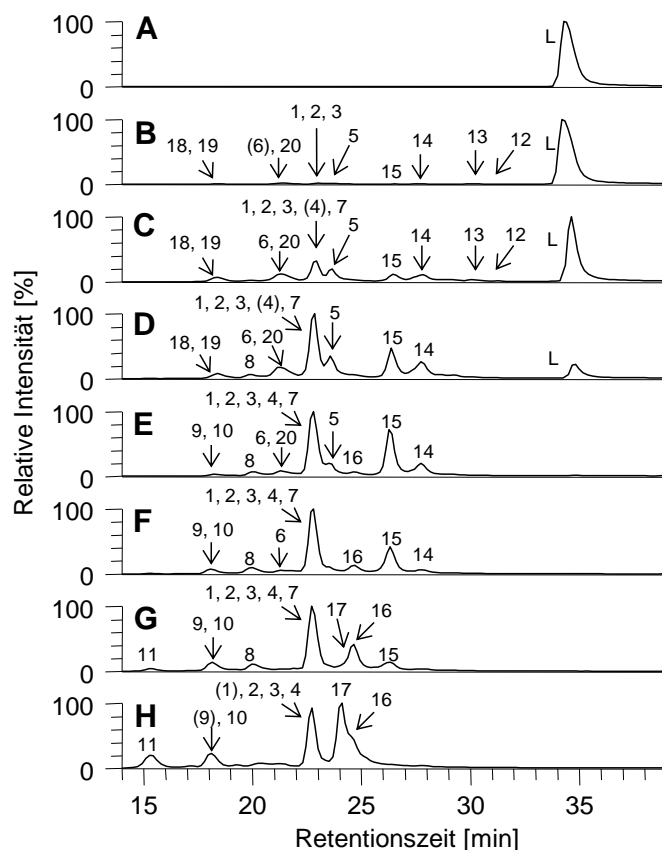


Abb. 24: Zeitabhängige Entwicklung des TIC des nicht-reduzierten Probensatzes des Pepsin-Verdau von LYZ bei pH 2. Inkubationszeit: (A) 1 min, (B) 5 min, (C) 15 min, (D) 30 min, (E) 1 h, (F) 2 h, (G) 4 h und (H) 24 h. Nummerierung der Peaks bezogen auf Abb. 21 (S. 80).

Um die schützende Wirkung von Disulfidbrücken vor dem Pepsin-katalysierten Verdau des Substrates zu bestätigen, wurde zuvor reduziertes LYZ in einem zusätzlichen Experiment mit Pepsin bei pH 2 inkubiert. Nach 1 h wurden lediglich kleine Peptide, hauptsächlich als einfach und zweifach positiv geladene Ionen, in der LC-MS Analyse beobachtet (Daten nicht dargestellt). Auch das proteolytische Muster im Hinblick auf die detektierten m/z -Werte wich stark von dem des zuvor nicht reduzierten LYZ ab.

Ein protektiver Effekt von Disulfidbrücken wurde auch in vorhergehenden, hauptsächlich gelbasierten Studien, beispielsweise in Zusammenhang mit der gastrointestinalen Verdauung des Hühnereiweißallergens Ovomuroid [187] oder dem Erdnussallergen Ara h 2 [188], gezeigt. Eine Reduktion der Allergenität von Getreide-

proteinen soll biotechnologisch durch eine Überexpression von Thioredoxinen erreicht werden [189]. Dabei handelt es sich um natürlich vorkommende Enzyme, die für die Reduktion von Disulfidbrücken verantwortlich sind und für die beobachtet wurde, dass sie die Verdaubarkeit von Proteinen erhöhen.

Kürzlich wurde der Abbau von Lactoferrin, einem Milchprotein von etwa 78 kDa, durch Pepsin zu verschiedenen Zeitpunkten ohne den Einsatz einer *Work* Protease mittels iTRAQ-8plex und LC-MALDI MS analysiert [190]. Dabei wurde das Auftreten größerer Spaltprodukte sowie von disulfidverbrückten Peptiden vernachlässigt. Dies könne möglicherweise in der verwendeten LC-MS Plattform begründet sein. Die Anwesenheit dieser PTM stellt jedoch, wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, einen bedeutenden Einflussfaktor auf die proteasekatalysierte Reaktion dar.

Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Pepsin-generierten Spaltprodukte von LYZ stimmen größtenteils mit einer kürzlich publizierten Studie überein [175]. Hierbei wurden, nach Reduktion der Spaltprodukte, Peptide zwischen 803 und 3.077 Da mittels LC-ESI MS beobachtet. Protease und Substrat wurden bei einem Verhältnis von 1:20 (w/w) für 1 h inkubiert. Zudem wurden Tricin-SDS-PAGE Analysen durchgeführt und im Anschluss Western Blots unter Verwendung von Blutseren allergischer Patienten angefertigt. Durch den nachfolgenden In-Gel-Verdau einer Bande von etwa 4 kDa und MALDI MS Analysen wurden drei mögliche IgE-bindende Peptidsequenzen identifiziert: (i) ¹¹AMKRHGLDNYRGYSLGN²⁷ (1.951 Da), (ii) ⁵⁷QINSRWWCNDGRTPGSRNLCNIPCSAL⁸³ (3.060 Da) und (iii) ¹⁰⁸WVAWRNRCKGTDVQA¹²² (1.789 Da). Da alle drei Peptide aus derselben Gelbande des Western Blots bestimmt wurden, konnte von den Autoren keine exakte Aussage über die tatsächliche Identität der IgE-bindenden Sequenz getroffen werden. Die drei benannten Peptidsequenzen wurden auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet. Für die Spaltprodukte (ii) und (iii) wurden intensive Signale über einen langen Zeitraum in der reduzierten Probenreihe festgestellt (Abb. 19, S. 78). Zudem wurden diese Peptide als Teil disulfidverbrückter Spaltprodukte identifiziert (Peptide 5, 7, 14 und 15 in Abb. 21, S. 80), wobei maximale relative Intensitäten nach etwa 1 h Inkubation mit Pepsin beobachtet wurden. Peptid (i) enthält kein Cystein und dementsprechend auch keine Disulfidbrücke, was den vergleichsweise schnellen Abbau nach Erreichen der maximalen relativen Intensität bei 15 min durch die Protease begründen könnte (Peptid 18 in Abb. 21, S. 80). Grundsätzlich ist fraglich, ob die IgE-bindende

Fähigkeit mit dem Fortschreiten der Pepsin-katalysierten Hydrolyse einer entsprechenden Peptidsequenz erhalten bleibt.

Das intakte Substrat wurde mittels LC-MS bis zu einer Inkubationszeit von 1 h beobachtet (Abb. 24E, S. 84). Anhand des Vergleiches der maximalen absoluten Signalintensität des intensivsten Ladungszustandes ($z=10$) bei einer Inkubationszeit von 1 min und 1 h wurde die Nachweisgrenze für nicht-reduziertes LYZ auf etwa 0,1 ng (7,1 fmol) geschätzt. Es ist zu beachten, dass die Nachweisgrenze von verschiedenen Faktoren, wie der Identität des Analyten oder der Probenmatrix, abhängt. Allgemein besitzen *Top-down* MS Analysen eine vergleichsweise niedrige Sensitivität [191], welche unter anderem im gleichzeitigen Auftreten einer höheren Anzahl von Ladungszuständen begründet ist. Für nicht-reduziertes LYZ wurden beispielsweise acht Ladungszustände von $z=8$ bis $z=15$ detektiert. Eine weitere Ursache der geringeren Sensitivität ist die mit steigendem Molekulargewicht der Analyten zunehmende Breite der Isotopenverteilung. So treten für LYZ theoretisch insgesamt zwanzig Isotopensignale auf, die eine relative Intensität von über 1% zum Basispeak besitzen (Information: IDCalc, Isotope Distribution Calculator, Version 0.3).

Das größte mittels LC-MS in der reduzierten Probenreihe identifizierte Spaltprodukt $^1\text{KVFGFR...PCSAL}^{83}$ (9.277 Da) wurde nicht in den Tricin-SDS-PAGE Analysen beobachtet. In der Folge scheint dieses Peptid, möglicherweise aufgrund des schnellen Abbaus durch Pepsin, nur in geringer Konzentration im Reaktionsgemisch enthalten zu sein. Eine Silberfärbung [192] der Tricin-SDS-PAGE Gele anstelle der klassischen Färbung mit Coomassie könnte die Visualisierung von niedrig abundanten Spaltprodukten potentiell ermöglichen, wurde in der vorliegenden Studie aber nicht durchgeführt.

Zusammenfassend wurde am Beispiel des physiologisch relevanten Protease-Substrat-Paares von Pepsin und dem Hühnereiweißallergen LYZ die Anwendbarkeit einer LC-MS Methode zur zeitabhängigen Analyse einer proteasekatalysierten Reaktion gezeigt. Die präsentierte Strategie ermöglicht die gleichzeitige Erfassung des intakten Substrates sowie von Spaltprodukten höheren, mittleren und niedrigeren Molekulargewichtes. Außerdem wurde der Einfluss von Disulfidbrücken auf die Verdaubarkeit des Substrates gezeigt.

6.4 Ausblick

In der beschriebenen Studie wurde eine Strategie zur zeitaufgelösten Analyse einer proteasekatalysierten Reaktion am Beispiel der im Magensaft enthaltenen Protease Pepsin und dem Substrat LYZ präsentiert. Auf diese Weise können intermediär auftretende Spaltprodukte sowie bevorzugte Spaltstellen identifiziert werden. Nach Inkubation von *Target* Protease und interessierendem Substrat für definierte Zeitintervalle liefern Tricin-SDS-PAGE Analysen einen ersten Überblick über die erfolgten proteolytischen Vorgänge. Relevante Proben werden in einer kombinierten *Top-down* und *Bottom-up* Strategie mittels LC-MS analysiert, wobei zu jedem Zeitpunkt der proteolytischen Reaktion simultan das intakte Substrat und generierte Spaltprodukte untersucht werden können.

Die Methode eignet sich nicht nur hervorragend für Modellsysteme der gastro-intestinalen Verdauung, sondern kann grundsätzlich auf nahezu jedes beliebige Protease-Substrat-Paar angewendet werden. *Top-down* LC-MS Analysen erlauben im Gegensatz zum klassischen Western Blot eine direkte Identifizierung von Spaltstellen. Dabei können abhängig von der verwendeten LC-MS Plattform routinemäßig intakte Substrate mit einem Molekulargewicht von bis zu 25 kDa [155] analysiert werden.

Aufgrund der niedrigen Komplexität der Probenmatrix konnte in der präsentierten Strategie auf zusätzliche Aufreinigungsschritte, neben der Verwendung einer Vorsäule zur Entsalzung vor der chromatographischen Trennung, verzichtet werden. Würden jedoch komplexere Modellsysteme, hohe Salzkonzentrationen oder Detergenzien eingesetzt werden, so müssten weitere Maßnahmen zur Probenaufreinigung vor der LC-MS Analyse, wie beispielsweise der Einsatz von SPE-Kartuschen, ergriffen werden.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, inwiefern die Anwesenheit von Disulfidbrücken die Proteolyse von LYZ durch Pepsin beeinflusst. Um disulfidverbrückte Spaltprodukte zu identifizieren, wurden MS²-Spektren manuell ausgewertet. Dies war in diesem Fall vergleichsweise leicht zu bewerkstelligen, da die Positionen der Disulfidbrücken in LYZ bekannt waren. Die Analyse von disulfidverbrückten Peptiden könnte zukünftig durch die Verwendung alternativer Fragmentierungstechniken, wie ETD [58,59] oder EThcD [193], oder speziell für die Analyse von Disulfidbrücken entwickelten Suchalgorithmen, wie DBond [182] oder SLinkS [183], erleichtert werden.

Der sequentielle Abbau der Spaltprodukte durch Pepsin, der über die Zeit beobachtet wurde, könnte grundsätzlich hilfreich für die Zuordnung von unbekanntem Disulfidbrücken sein. Massendifferenzen zwischen den zu verschiedenen Zeitpunkten der proteasekatalysierten Reaktion auftretenden Spaltprodukten können erste Hinweise auf die betreffenden an der Disulfidbrücke beteiligten Aminosäuresequenzen liefern. Die Analyse absoluter Signalintensitäten einzelner proteasegenerierter Peptide über die Zeit in einem reduzierten und nicht-reduzierten Probensatz kann die Identifizierung disulfidverbrückter Spaltprodukte vereinfachen, da zu bestimmten Zeitpunkten im Reaktionsgemisch niedrig abundante von hoch abundanten Analyten unterschieden werden können. Allgemein können disulfidverbrückte Spaltprodukte von Peptiden ohne Cystein bzw. mit freien Thiolgruppen durch einen Vergleich der Retentionszeiten vor und nach der Reduktion unterschieden werden. Ausschließlich die letzteren eluieren dabei zum selben Zeitpunkt.

Die präsentierte Strategie könnte künftig auch zur Beurteilung des Einflusses weiterer PTMs im Zusammenhang mit proteasekatalysierten Reaktionen verwendet werden. Beispielsweise könnte der Abbau eines phosphorylierten mit dem des entsprechenden unphosphorylierten Substrates durch eine bestimmte Protease verglichen werden.

Eine weitere Möglichkeit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methode ist die gleichzeitige Inkubation einer Protease mit mehreren zugehörigen Substraten. Die zeitabhängige Analyse könnte Aufschluss darüber geben, ob die Protease zu manchen Substraten eine höhere Affinität als zu anderen besitzt und dementsprechend bestimmte Spaltstellen bevorzugt.

Im Hinblick auf die erhaltenen Ergebnisse für das Hühnereiweißallergen LYZ wäre es interessant die IgE-bindenden Peptidsequenzen eindeutig zu identifizieren, da in einer früheren Studie [175] lediglich drei potentiell dafür verantwortliche Kandidaten aus ein und derselben Bande eines Western Blots zugeordnet werden konnten. Konsequenterweise sollten die beim Pepsin-Verdau entstehenden Spaltprodukte vor der immunologischen Analyse mit Patientenserum in einem nächsten Experiment einzeln vorliegen. Beispielsweise könnte das Reaktionsgemisch zunächst mithilfe von präparativer HPLC fraktioniert und anschließend mithilfe eines Dot Blots analysiert werden. Zusätzlich könnte anhand der Untersuchung von IgE-bindenden Spaltprodukten zu den einzelnen Zeitpunkten des simulierten Magenverdaus erörtert werden, welche Mindestgröße Epitope für eine Bindung von IgE-Antikörpern aufweisen müssen.

Ein weiterer Aspekt wäre die Identifizierung von antimikrobiellen Peptidsequenzen, wobei hier zunächst in verschiedenen zu diesem Zweck eingerichteten Datenbanken recherchiert werden könnte. Zudem könnten einzelne Spaltprodukte nach Fraktionierung oder unter Verwendung von entsprechenden synthetischen Peptiden mit diversen Bakterienkulturen inkubiert und die Wachstumsrate der Mikroorganismen verfolgt werden.

7 **Top-down Identifizierung der Meprin- α/β Spaltstellen in Interleukin-6**

7.1 **Einleitung**

7.1.1 **Meprin- α , Meprin- β und Interleukin-6**

Die Astazin-Proteasen Meprin- α und Meprin- β zählen, wie ADAMs oder MMPs, zur Metzinkin Superfamilie [96]. Das bis heute gesammelte Wissen um die physiologisch sowie pathologisch interessanten Proteasen wurde ausführlich in einer Reihe von Übersichtsartikeln zusammengefasst [194–196]. In der vorliegenden Arbeit soll ausschließlich ein kurzer Einblick in die Thematik geboten werden.

Erstmals wurden die Enzyme in Niere (Meprin, *Metalloprotease from Renal Tissue*) [197,198] und Dünndarm [199,200], später unter anderem auch in der Haut [201] oder in verschiedenen Tumorgeweben [194] identifiziert. Die extrazellulär aktiven Proteasen weisen jeweils eine Multidomänenstruktur auf und liegen stark glykosyliert vor.

Meprin- α wird innerhalb des sekretorischen Transportweges von Furin prozessiert und anschließend von der Zelle freigesetzt [202]. Im extrazellulären Bereich oligomerisiert das Enzym zu nicht-kovalenten Komplexen von bis zu 6 MDa [203,204]. Damit handelt es sich bei Meprin- α um die bis heute größte bekannte sezernierte Protease. Meprin- β kommt demgegenüber hauptsächlich in der membrangebundenen Form vor. Jedoch kann die Protease von den *Sheddases* ADAM10 [27] oder ADAM17 [205] freigesetzt werden. Umgekehrt wurde gezeigt, dass Meprin- β für die vollständige Aktivierung von ADAM10 verantwortlich ist (S. 9) [27].

Meprin- α und Meprin- β wurden unter anderem mit der Entstehung von Fibrosen, mit Erkrankungen der Niere, beispielsweise dem akuten Nierenversagen, mit neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimer-Krankheit, mit Krebs oder mit Entzündungskrankheiten, wie Morbus Crohn, in Zusammenhang gebracht [195]. Substratkandidaten der Metalloproteasen wurden mithilfe von Meprin- α/β -Knockout Mäusen [206,207] sowie der TAILS Strategie (S. 18) [27] identifiziert. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass beide Proteasen für die Freisetzung der N- sowie C-terminalen Propeptide aus Prokollagen Typ I verantwortlich sind und damit einen signifikanten Beitrag zur Ausbildung von Kollagenfibrillen leisten [208]. Die membrangebundene Form von

Meprin- β hydrolysiert zudem das Substrat APP an ähnlichen oder identischen Positionen wie die β -Sekretase BACE1 [209,210]. Außerdem sind sowohl Meprin- α als auch Meprin- β für die Aktivierung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β (Interleukin-1- β) verantwortlich [211,212], während aktives IL-18 (Interleukin-18) ausschließlich von Meprin- β aus dem inaktiven Vorläuferprotein freigesetzt wird [213]. Vor Kurzem wurde jedoch eine Inaktivierung des Zytokins IL-6 (Interleukin-6) durch die beiden Proteasen beobachtet [214]. Innerhalb des Forschungsprojektes A9 des SFB 877 sollte dieser Zusammenhang näher untersucht werden. Ein Teilaspekt und Thema des vorliegenden Kapitels war dabei die Identifizierung der Meprin- α/β Spaltstellen in rekombinantem humanem IL-6 (rhIL-6). Zu diesem Zweck sollte die *Top-down* Massenspektrometrie eingesetzt werden.

7.1.2 *Top-down* Massenspektrometrie

Routinemäßig sind reine *Bottom-up* sowie Kombinationen aus *Top-down* und *Bottom-up* Strategien in der Proteomik bis heute am weitesten verbreitet. Jedoch ist in den letzten Jahren ein stetig wachsender Trend in Richtung der *Top-down* Proteomik zu erkennen, da die massenspektrometrische Analyse intakter Proteine verschiedene Vorteile mit sich bringt.

Zum einen wird dabei im Gegensatz zu oft lückenhaften *Bottom-up* MS Analysen eine hundertprozentige Sequenzabdeckung erreicht [191]. Dies ermöglicht eine direkte Unterscheidung von Protein-Isoformen, die z. B. durch alternatives Spleißen, Genmutationen oder diverse PTMs gebildet werden können. Zu letzteren zählt auch die proteasekatalysierte Hydrolyse einer Peptidbindung. Wie bereits in Kapitel 6 erläutert wurde, erlaubt der Verzicht auf eine unabhängige *Work* Protease vor der massenspektrometrischen Analyse eine direkte Identifizierung von Spaltprodukten sowie von zugehörigen Spaltstellen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit auch für die Proteasen Meprin- α/β und das zu untersuchende Substrat rhIL-6 ausgenutzt. Zudem kommen *Top-down* Analysen in den meisten Fällen ohne eine langwierige Probenvorbereitung aus, die beispielsweise komplizierte Derivatisierungsstrategien beinhaltet.

Nichtsdestotrotz unterliegen *Top-down* gegenüber *Bottom-up* Analysen, vor allem im Hinblick auf den Hochdurchsatz komplexer Proben, bis heute einigen methodischen sowie technologischen Einschränkungen. Klassische Trennmethode auf Proteinebene, wie SDS-PAGE oder 2D-GE, gehen meist mit hohen Probenverlusten und geringer

Reproduzierbarkeit einher [174]. Die chromatographische Trennung von intakten Proteinen ist im Vergleich zu der von Peptiden oft mit einer niedrigeren Auflösung oder einer irreversiblen Adsorption der Analyten an die stationäre Phase verbunden. In den letzten Jahren wurden jedoch große Fortschritte sowohl in Zusammenhang mit *offline* als auch *online* an die MS Analyse gekoppelten Trennmethode erzielt [174,191]. An dieser Stelle sei exemplarisch die Entwicklung neuartiger Trennmethode, wie die des GELFrEE (*Gel-eluted Liquid Fraction Entrapment Electrophoresis*) Ansatzes [215], oder die Verwendung von speziellen Säulenmaterialien, wie monolithischen stationären Phasen [172], zur Flüssigchromatographie von Proteinen zu nennen.

Neben geeigneten Methoden zur Trennung von intakten Proteinen ist der Einsatz von Massenspektrometern, die sowohl eine hohe Auflösung als auch Massengenauigkeit aufweisen, erforderlich [191]. Meist werden zu diesem Zweck an ESI gekoppelte FT-ICR (Fouriertransformations-Ionencyclotronresonanz) oder Orbitrap Massenanalysatoren verwendet, wobei letztere weiter verbreitet sind. Die Sensitivität der Geräte stellt eine zusätzliche technologische Anforderung dar. Dies liegt, wie bereits in Kapitel 6.3.4 auf S. 86 erwähnt, zum einen am gleichzeitigen Auftreten einer Vielzahl von Ladungszuständen ein und desselben Proteins und zum anderen an der mit steigender Masse des Analyten zunehmend breiten Isotopenverteilung [191]. Aus diesem Zusammenhang folgt, dass die *Top-down* MS von besonders großen Analyten eine technologische Herausforderung darstellt. Routinemessungen intakter Proteine sind auf ein Molekulargewicht von bis zu etwa 25 kDa [155] beschränkt. Zur Aufklärung der Aminosäuresequenzen von Proteinen auf der Basis von MS²-Spektren werden Fragmentierungstechniken, wie HCD oder ETD, angewendet. Abschließend können die durch *Top-down* Analysen erhaltenen Daten abhängig von der Probenkomplexität entweder manuell oder automatisiert mit zu diesem Zweck entwickelten Programmen ausgewertet werden.

7.2 Material und Methoden

7.2.1 Chemikalien

Acetonitril	$\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
FA	98%, Sigma-Aldrich
HEPES	Sigma-Aldrich
IAA	Sigma-Aldrich
MilliQ-Wasser	18,2 M Ω /cm, vorbereitet mit dem arium611 System, Sartorius (Göttingen, Deutschland)
TFA	99%, Sigma-Aldrich

7.2.2 Probenbeschreibung

Drei Proben wurden von Felix Jäckle aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly (Forschungsprojekt A9, SFB 877) vorbereitet. Darunter befanden sich eine rhIL-6 Kontrolle sowie mit Meprin- α und mit Meprin- β inkubiertes rhIL-6. Humanes IL-6 wurde angelehnt an [216] rekombinant in *Escherichia coli* exprimiert (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Joachim Grötzinger, Forschungsprojekt A6, SFB 877); humanes Meprin- α und Meprin- β wurden rekombinant in Insektenzellen hergestellt (Forschungsprojekt A9, SFB 877) [201,203]. Es wurden jeweils 100 μg rhIL-6 mit Meprin- α/β (100 nM) oder ohne die Zugabe der Proteasen für 30 min bei 37 °C inkubiert, anschließend für 5 min bei 95 °C hitzedenaturiert und auf Eis gekühlt. Die rhIL-6 Konzentration der Proben betrug etwa 0,5 mg/ml.

7.2.3 Probenvorbereitung zur *offline* ESI LTQ Orbitrap MS

Die Proben wurden mit ZipTip-C18 Pipettenspitzen (Spitzengröße P10; Kapazität, 5 μg ; Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) aufgereinigt. Je Probe wurden dafür 5 μg rhIL-6 (10 μl) eingesetzt und zunächst mit 10 μl 1% FA versetzt. Das C18 Material wurde mit 1% FA equilibriert. Nach Beladen mit der Probe wurde mit 1% FA gewaschen und anschließend in 20 μl 70% ACN/1% FA eluiert (Konzentration, 0,25 mg/ml).

7.2.4 Offline ESI LTQ Orbitrap MS

Für die *offline* ESI LTQ Orbitrap MS Analyse der Proben an einem LTQ Orbitrap Velos Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland) wurden PicoTip Emitter (Glass Tip; Beschichtung, 1P-4P; New Objective, Woburn, USA) mit jeweils 10 μ l Probe (2,5 μ g rhIL-6) beladen. MS Daten wurden über mehrere Minuten in einem Massenbereich von 600 bis 2.000 m/z bei einer Auflösung von 100.000 im Orbitrap Massenanalysator akquiriert. Anhand der MS1-Spektren wurden Vorläuferionen zur HCD Fragmentierung (NCE, 30%; Isolationsfenster, 6 m/z ; Aktivierungszeit, 0,1 ms) ausgewählt: rhIL-6 Kontrolle, 1056,45 m/z , 1046,25 m/z , $z=20$; rhIL-6 inkubiert mit Meprin- β , 1023,88 m/z , 1017,38 m/z , $z=20$. Für die Meprin- α Probe wurden keine Vorläuferionen zur Fragmentierung ausgewählt, da keine signifikanten Unterschiede zur rhIL-6 Kontrolle in den MS1-Spektren beobachtet werden konnten. Die Analyse der Fragmentationen wurde im Orbitrap Massenanalysator bei einer Auflösung von 100.000 vollzogen.

7.2.5 Online LC-ESI LTQ Orbitrap MS

Zur Analyse der Proben mittels LC-ESI LTQ Orbitrap MS wurden diese ohne vorhergehende Aufreinigung mit 0,1% TFA zu 0,01 mg/ml verdünnt und jeweils 50 ng rhIL-6 injiziert. Es wurde ein an das oben benannte LTQ Orbitrap Velos Massenspektrometer gekoppeltes UltiMate 3000 nano-LC-System (Dionex, Idstein, Deutschland) verwendet, das mit einer C8 Vorsäule und einer monolithischen Trennsäule (beide Säulen, Kapitel 6.2.2, S. 61) ausgestattet wurde. Es wurde ein PicoTip Emitter (Silica Tip; Beschichtung, P200P; New Objective) für die Ionenquelle benutzt.

Tabelle 8: Gradient aus den Eluenten A (0,05% FA) und B (80% ACN/0,04% FA) zur Trennung des Probengemisches bei einer Flussrate von 500 nl/min und einer Säulentemperatur von 60 °C.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	95	5
4	95	5
4,1	90	10
45	20	80
46	5	95
56	5	95
57	95	5
70	95	5

Die Analyten wurden zunächst mit 3% ACN/0,1% TFA bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ für 4 min auf der Vorsäule konzentriert und entsalzt und anschließend mit einem Gradienten aus den Eluenten A (0,05% FA) und B (80% ACN/0,04% FA) auf der Trennsäule separiert (Tabelle 8). Die Säulenofentemperatur betrug 60 °C und die Flussrate 500 nl/min .

In einer ersten Messung wurden mit fünf *Microscans* und einer maximalen Injektionszeit von 1.000 ms ausschließlich MS1-Spektren im Massenbereich von 500 bis 2.000 m/z und bei einer Auflösung von 100.000 im Orbitrap Massenanalysator aufgenommen. In einer zweiten Messung lag der Fokus mit vier *Microscans* und einer maximalen Injektionszeit von 1.000 ms für MSⁿ Experimente hingegen auf der Aufnahme von MS2-Spektren. Die Vorläuferionen wurden anhand der vorangegangenen MS1-Spektren und der durch *offline* ESI MS Messungen erhaltenen Ergebnisse ausgewählt. Nach einem MS *Full Scan* zwischen 500 und 2.000 m/z mit einem *Microscan* und einer maximalen Injektionszeit von 1.000 ms bei einer Auflösung von 60.000 im Orbitrap Massenanalysator wurden zwei MS2 *Scan Events* mit HCD Fragmentierung (NCE, 30%; Isolationsfenster, 5 m/z ; Aktivierungszeit, 0,1 ms) eingefügt. Dabei wurde eine globale Massenliste implementiert: von 10 bis 39 min wurden, falls vorhanden, die Vorläuferionen 797,39 m/z und 668,34 m/z ($z=1$) fragmentiert; von 39 bis 50 min die Vorläuferionen 960,45 m/z , 951,26 m/z , 930,89 m/z und 925,02 m/z ($z=22$).

7.2.6 Auswertung der Daten

Die in den MS Experimenten (Kapitel 7.2.4 und 7.2.5) generierten Daten wurden manuell ausgewertet. Unterstützend wurde dabei das Programm mMass (Version 2.4) eingesetzt. Die theoretische Isotopenverteilung der Analyten wurde mit dem Programm IDCalc (Isotope Distribution Calculator, Version 0.3) berechnet.

7.3 Ergebnisse und Diskussion

7.3.1 Analytische Strategie

Um die Proteolyse des Zytokines IL-6 durch die Astazin-Proteasen Meprin- α und Meprin- β näher zu untersuchen, wurden drei Proben analysiert: (i) eine rhIL-6 Kontrolle sowie (ii) mit Meprin- α bzw. (iii) Meprin- β inkubiertes rhIL-6. Die Analyten lagen jeweils in Lösung vor.

Humanes IL-6 (UniProt, P05231) enthält zwei Disulfidbrücken, kein freies Cystein und besitzt ein Molekulargewicht von etwa 21 kDa. Damit handelt es sich um ein vergleichsweise kleines Protein, das routinemäßig mittels *Top-down* Massenspektrometrie untersucht werden kann [155]. Zudem waren die Proben von geringer Komplexität, da sie unter Vernachlässigung der *Target* Proteasen ausschließlich das intakte Substrat oder die aus der Proteolyse hervorgegangenen Spaltprodukte enthielten. In der Konsequenz war eine Fraktionierung oder Trennung der Analyten vor der MS Analyse nicht zwingend erforderlich.

Es wurden zwei verschiedene Strategien gewählt: *offline* ESI LTQ Orbitrap MS und *online* LC-ESI LTQ Orbitrap MS. Bei der ersten wurden die Proben vor der MS Messung durch Festphasenextraktion entsalzt. Die Proben wurden anschließend ohne chromatographische Trennung direkt in das Massenspektrometer infundiert. Auf diese Weise konnten sowohl die MS1 als auch die MS2 Daten über einen längeren Zeitraum hinweg aufgenommen werden.

In der zweiten Strategie wurden die Proben ohne vorherige Aufreinigung mithilfe eines an das Massenspektrometer gekoppelten nano-LC-Systems entsalzt und aufgetrennt. Hierfür wurde die in Kapitel 6.3.2 (S. 67) beschriebene Säulenkombination aus einer C8 Vorsäule und einer monolithischen Trennsäule bei einer Säulenofentemperatur von 60 °C verwendet. MS Daten konnten folglich nur während der Elution der Analyten akquiriert werden. Um die Datenqualität zu verbessern wurden die Proben jeweils zweimal injiziert. Während in der ersten Messung ausschließlich MS1-Spektren aufgenommen wurden, lag der Fokus in der zweiten Messung auf den MS2-Spektren.

verlängerte Form als rh(MAP)IL-6 bezeichnet. Bezieht sich eine Aussage auf die Präparation im Allgemeinen, so wird der Ausdruck rhIL-6 verwendet.

In der Publikation, auf der das verwendete Protokoll zur rekombinanten Produktion von humanem IL-6 in *Escherichia coli* beruht, wurde ebenfalls das gleichzeitige Auftreten der beiden Komponenten rh(P)IL-6 und rh(MAP)IL-6 beschrieben [216]. Humanes, nicht rekombinant hergestelltes IL-6 (UniProt, P05231) enthält im Unterschied zu rh(P)IL-6 nach Entfernung des Signalpeptides kein N-terminales Prolin (1 VPPGE...ALRQM¹⁸³); die übrige Aminosäuresequenz und auch die Verknüpfung der Disulfidbrücken stimmen hingegen mit der von rh(P)IL-6 und rh(MAP)IL-6 überein. Dies wurde in der oben erwähnten Studie [216] durch einen tryptischen Verdau der beiden Proteinvarianten und eine anschließende MS Analyse der entstandenen Peptide überprüft. Die Identität von rh(P)IL-6 und rh(MAP)IL-6 wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl anhand der in den MS1-Spektren (Abb. 26) beobachteten intakten Massen als auch mithilfe der manuellen Auswertung der MS2-Spektren (rh(P)IL-6, Abb. 27, S. 101; rh(MAP)IL-6, Anhang, Abb. A5, S. 146) aufgeklärt.

Das MS1-Spektrum der *offline* ESI MS Analyse (Abb. 26A) zeigt bei ähnlicher absoluter Intensität ein deutlich höheres Hintergrundrauschen als das der *online* LC-ESI MS Analyse (Abb. 26B). Dies könnte daran liegen, dass neben rh(P)IL-6 und rh(MAP)IL-6 weitere Proteine oder auch Peptide als Kontaminationen in der Probe enthalten waren, die demnach ebenfalls ionisiert wurden. Hohe Salzkonzentrationen als Ursache sind demgegenüber als eher unwahrscheinlich einzustufen, da die Proben vor der MS Analyse mittels Festphasenextraktion aufgereinigt wurden.

Bei der *online* LC-ESI MS Analyse wurden potentielle Verunreinigungen niedrigeren Molekulargewichtes, wie Salze oder kleinere Peptide, durch die Verwendung einer Vorsäule entfernt. Kontaminierende Proteine sowie Peptide, die durch die C8 Vorsäule retiniert wurden, wurden möglicherweise während der Chromatographie von den Analyten rh(P)IL-6 und rh(MAP)IL-6 getrennt und demnach zeitversetzt ionisiert. Jedoch wurde unter den zur *online* LC-ESI MS Messung gewählten chromatographischen Bedingungen, vermutlich aufgrund der nur minimal abweichenden Aminosäuresequenz, keine Trennung von rh(P)IL-6 und rh(MAP)IL-6 erreicht.

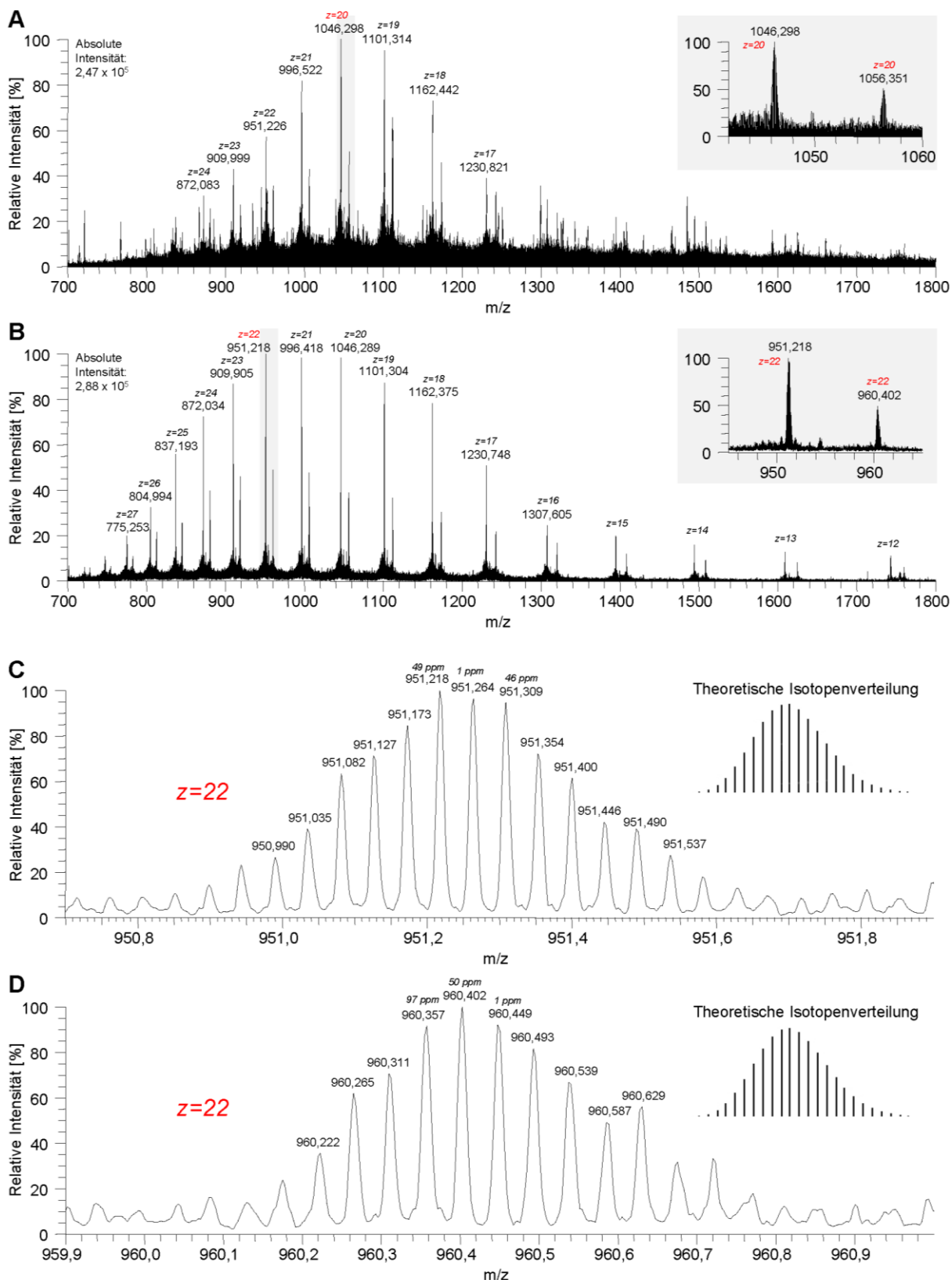


Abb. 26: Legende auf der nächsten Seite.

Abb. 26: MS1-Spektren der rhIL-6 Kontrolle. (A) Ergebnis der offline ESI MS Analyse, Spektren akkumuliert von 0,53 bis 7,36 min. (B) Ergebnis der online LC-ESI MS Analyse, Spektren akkumuliert von 40,12 bis 41,44 min. (C) Ausschnitt des Isotopenmusters von rh(P)IL-6 ($z=22$) der online LC-ESI MS Analyse. (D) Ausschnitt des Isotopenmusters von rh(MAP)IL-6 ($z=22$) der online LC-ESI MS Analyse. Über den drei intensivsten Isotopensignalen aus (C) und (D) wird die Massenabweichung zum theoretisch intensivsten Isotopensignal der Isotopenverteilung (C, 951,265 m/z , $z=22$; D, 960,450 m/z , $z=22$) in ppm angegeben. Die theoretische Isotopenverteilung wurde mithilfe des Programmes IDCalc berechnet.

Neben einem verminderten Hintergrundrauschen wurde bei der *online* LC-ESI MS Analyse eine breitere sowie in ihrer Intensität verschobene Ladungsverteilung der Analyten beobachtet. Während im MS1-Spektrum der *offline* ESI MS Messung oberhalb einer relativen Intensität von 50% fünf verschiedene Ladungszustände von $z=18$ bis $z=22$ für rh(P)IL-6 beobachtet wurden, wurden bei der *online* LC-ESI MS Analyse entsprechend neun Ladungszustände von $z=17$ bis $z=25$ verzeichnet. Das Intensitätsmaximum wurde für rh(P)IL-6 bei der *offline* ESI MS Messung für den Ladungszustand $z=20$ und bei der *online* LC-ESI MS Analyse für $z=22$ detektiert. Diese Beobachtungen lassen sich möglicherweise durch leicht abweichende pH-Werte, verschiedene Analytkonzentrationen oder Lösungsmittelzusammensetzungen der in die Ionenquelle eingebrachten Proben erklären [217]. Darüber hinaus können auch instrumentelle Faktoren einen Beitrag zu diesem Effekt leisten. Beispielsweise wurden, bedingt durch den *Offline-* bzw. *Online-*Ansatz, unterschiedlich beschichtete Emitter in der Ionenquelle verwendet.

Die folgenden Ergebnisse der rhIL-6 Kontrolle werden aufgrund der besseren Datenqualität anhand der *online* LC-ESI MS Analyse betrachtet. Aus den relativen Intensitäten der Signale lässt sich abschätzen, dass rh(P)IL-6 als die Hauptkomponente mit etwa der doppelten Konzentration von rh(MAP)IL-6 in der Präparation enthalten war (Abb. 26B). Zur Untersuchung der intakten Massen wurde $z=22$ als intensivster Ladungszustand herangezogen. Mit zunehmendem Molekulargewicht verschiebt sich das intensivste Signal der Isotopenverteilung zu höheren Massen hin; ab etwa 5.000 Da [218] kann das monoisotopische Signal in der Regel nur noch schwer bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die drei intensivsten Signale der Isotopenverteilung jeweils mit dem theoretisch intensivsten für rh(P)IL-6 (951,265 m/z , $z=22$, Abb. 26C) bzw. rh(MAP)IL-6 (960,450 m/z , $z=22$, Abb. 26D) verglichen und die Massenabweichung in ppm berechnet. Dabei wurde die Anwesenheit von zwei Disulfidbrücken berücksichtigt. Da die experimentell bestimmte Isotopenverteilung,

hinsichtlich der Intensität einzelner Isotopensignale, nicht exakt mit der theoretischen übereinstimmt, ist es eine Herausforderung den wirklich abundantesten m/z -Wert zu bestimmen. So wurden für die drei intensivsten Isotopensignale von rh(P)IL-6 Massenabweichungen von 49, 1 und 46 ppm (entspricht etwa -1 , 0 und $+1$ Da) und für die von rh(MAP)IL-6 von 97, 50 und 1 ppm (entspricht etwa -2 , -1 und 0 Da) berechnet. Die Anwesenheit von freien Cysteinen konnte durch eine Inkubation der rhIL-6 Kontrolle mit IAA ausgeschlossen werden; es wurde keine Carbamidomethylierung beobachtet (Daten nicht dargestellt).

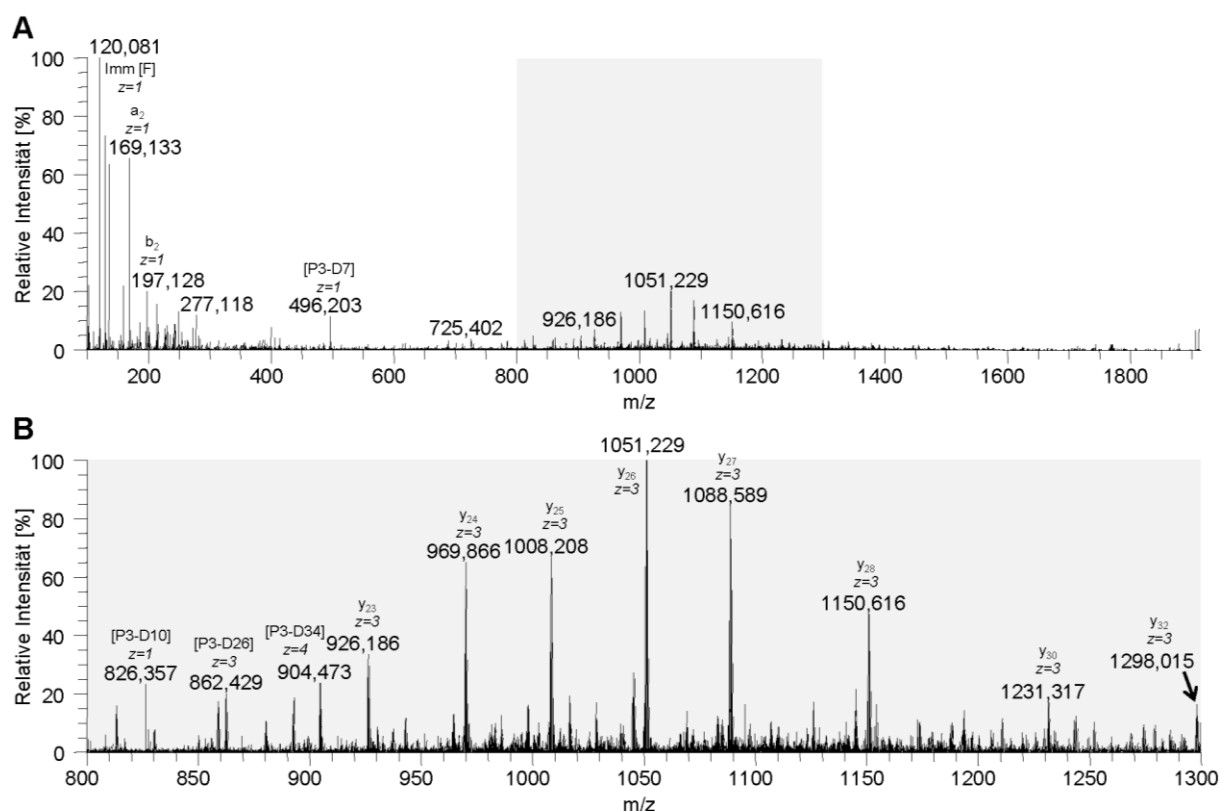


Abb. 27: MS2-Spektrum der online LC-ESI MS Analyse von rh(P)IL-6. (B) zeigt einen Ausschnitt von (A). Es ist zu beachten, dass ausschließlich die intensivsten identifizierten Fragmentationen im Spektrum gekennzeichnet wurden. Interne Fragmente wurden in Klammern [X-Y] gesetzt.

Die Identität von rh(P)IL-6 (Abb. 27) und rh(MAP)IL-6 (Anhang, Abb. A5, S. 146) wurde zudem durch die manuelle Auswertung der MS2-Spektren bestätigt. Da die MS2-Spektren sowohl der *offline* ESI MS als auch der *online* LC-ESI MS Analyse ähnliche Ergebnisse lieferten, werden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die der letzteren abgebildet.

Grundsätzlich wurden neben Immoniumionen hauptsächlich γ -Ionen und eher wenige α - und β -Ionen beobachtet (Übersicht der für rh(P)IL-6 und rh(MAP)IL-6 identifizierten β - und γ -Ionen, Abb. 25, S. 97). Außerdem wurden für beide Komponenten einige aus dem N-terminalen Bereich der Proteinvarianten stammende interne Fragmente detektiert. Interessanterweise wurden bei rh(P)IL-6 vergleichsweise hohe Intensitäten für interne Fragmente mit Pro-3 am N-Terminus und Asp-7, Asp-10, Asp-26 oder Asp-34 am C-Terminus festgestellt (Abb. 27). Entsprechend wurden bei rh(MAP)IL-6 hohe Intensitäten für dieselben internen Fragmente mit Pro-5 am N-Terminus und Asp-9, Asp-12, Asp-28 und Asp-36 am C-Terminus beobachtet (Anhang, Abb. A5, S. 146). Die bevorzugte Spaltung von Xxx-Pro sowie von Asp-Xxx Bindungen während der Fragmentierung wurde in verschiedenen vorhergehenden Studien gezeigt [219–222]. Im Fall von rh(P)IL-6 und rh(MAP)IL-6 könnte das präferierte Entstehen interner Fragmente das geringe Auftreten von β -Ionen erklären.

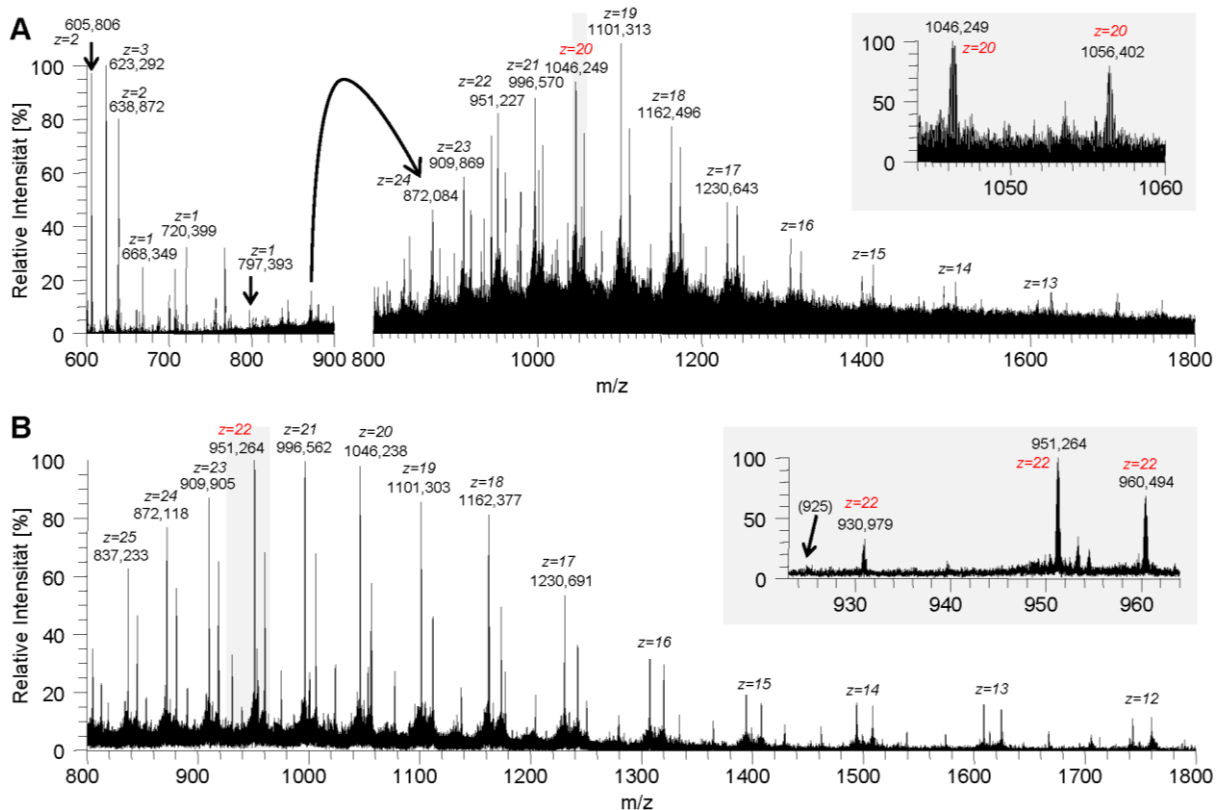


Abb. 28: MS1-Spektren der Inkubation von rhIL-6 mit Meprin- α . (A) Ergebnis der offline ESI MS Analyse, Spektren akkumuliert von 0,31 bis 10,48 min. (B) Ergebnis der online LC-ESI MS Analyse, Spektren akkumuliert von 40,13 bis 41,45 min.

Für das mit Meprin- α inkubierte rhIL-6 wurden in den MS1-Spektren beider analytischer Strategien vornehmlich die zwei Varianten des intakten Substrates detektiert (Abb. 28). Erneut wurde für die *offline* ESI MS (Abb. 28A) im Vergleich zu der *online* LC-ESI MS Analyse (Abb. 28B) ein erhöhtes Hintergrundrauschen verzeichnet.

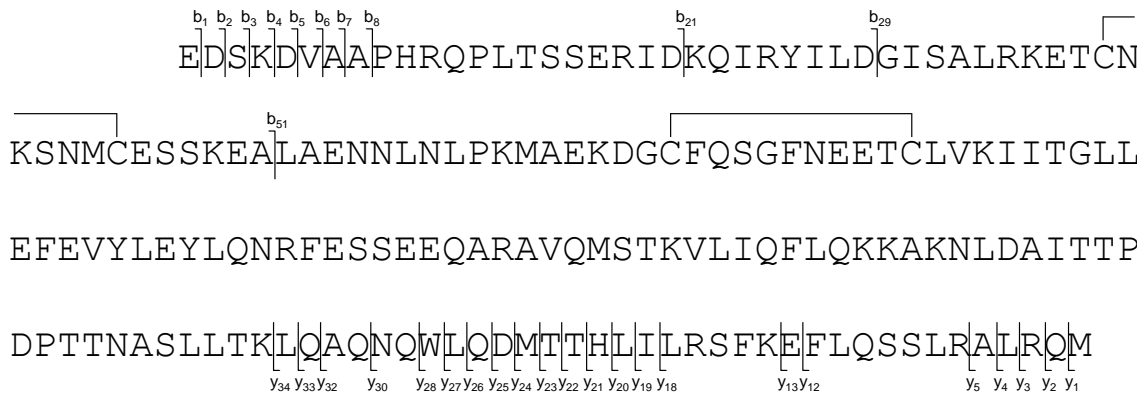
Neben intensiven Signalen für rh(P)IL-6 und rh(MAP)IL-6 wurde ein potentiell Spaltprodukt des m/z -Wertes 930,979 ($z=22$) beobachtet (Abb. 28B), auf welches später im Text zurückgegriffen wird. Vor der Elution der beiden rhIL-6 Komponenten wurden bei der *online* LC-ESI MS Analyse außerdem die m/z -Werte verschiedener rhIL-6 Peptide (z. B. DMTTHLILR oder IDKQIRYILDGIS) mit geringer Intensität detektiert, die auf eine eher unspezifische Hydrolyse des Substrates rhIL-6 durch Meprin- α an mehreren Stellen der Aminosäuresequenz hindeuten könnten (Daten nicht dargestellt). Einige dieser m/z -Werte wurden auch bei der *offline* ESI MS Analyse im unteren Massenbereich des MS1-Spektrums (Abb. 28A, links) festgestellt.

Bei der MS Analyse des mit Meprin- β inkubierten rhIL-6 wurden zwei Spaltprodukte von höherem Molekulargewicht detektiert, die annähernd zu gleichen Teilen im Reaktionsgemisch enthalten waren. Diese wurden als ${}^6\text{EDSKD...ALRQM}^{184}$ mit einem Molekulargewicht von 20.458 Da (Abb. 29A) und als ${}^7\text{DSKDV...ALRQM}^{184}$ mit einem Molekulargewicht von 20.329 Da (Abb. 29B) identifiziert (Nummerierung bezieht sich auf rh(P)IL-6). Diese C-terminalen Spaltprodukte werden nachfolgend als SP1 und SP2 bezeichnet. Es wurde kein verbleibendes rh(P)IL-6 bzw. rh(MAP)IL-6 beobachtet.

Allgemein wurde auch für diese Probe bei der *offline* ESI MS Analyse (Abb. 30A, S. 105) ein höheres Hintergrundrauschen als bei der *online* LC-ESI MS Analyse (Abb. 30B, S. 105) festgestellt. Jedoch wurde durch die *offline* ESI MS Analyse die Detektion der zu den C-terminalen Spaltprodukten SP1 und SP2 zugehörigen N-terminalen Spaltprodukte des intakten Substrates rh(MAP)IL-6 ermöglicht: MAPVPPG (theoretisch, 668,344 m/z , $z=1$) und MAPVPPGE (theoretisch, 797,386 m/z , $z=1$) (Abb. 30A, links, S. 105). Die N-terminalen aus der Hydrolyse von rh(P)IL-6 stammenden Spaltprodukte PVPPG (theoretisch, 466,266 m/z , $z=1$) und PVPPGE (theoretisch, 595,309 m/z , $z=1$) lagen außerhalb des Messbereichs von 600 bis 2.000 m/z . Bei der *online* LC-ESI MS Analyse wurde, möglicherweise aufgrund zu niedriger Retention durch die C8 Vorsäule, keines der beschriebenen N-terminalen Spaltprodukte beobachtet. MS1-Spektren wurden zwischen 500 und 2.000 m/z aufgenommen.

Es konnte keine chromatographische Trennung von SP1 und SP2 in der *online* LC-ESI MS Analyse erreicht werden. Die Retentionszeit blieb auch im Vergleich zu den intakten Substraten rh(P)IL-6 und rh(MAP)IL-6 unverändert. Eine Veränderung des Gradienten brachte keine Trennung der Analyten (Daten nicht dargestellt). Dies ist wahrscheinlich darin begründet, dass sich die vier Proteinvarianten jeweils nur um wenige Aminosäuren voneinander unterscheiden.

A > SP1 (Meprin- β)



B > SP2 (Meprin- β)

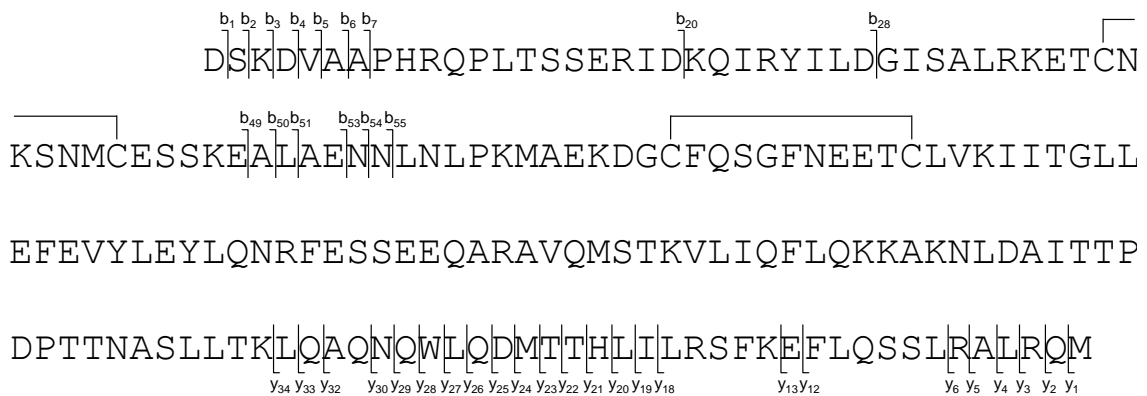


Abb. 29: Aminosäuresequenzen der durch Meprin- β aus rhIL-6 generierten C-terminalen Spaltprodukte SP1 (A) und SP2 (B). Identifizierte b- und y-Ionen wurden gekennzeichnet (*online* LC-ESI MS). Die zwei für humanes IL-6 (UniProt, P05231) bekannten Disulfidbrücken wurden als schwarze Klammern dargestellt.

Neben SP1 und SP2 wurde ein Analyt des Molekulargewichtes 19.998 Da beobachtet, der keiner der beiden Varianten des intakten Substrates zugeordnet werden konnte (Abb. 30B, Asteriskus). Dabei könnte es sich um eine in der Meprin- β Präparation enthaltene Kontamination oder ein durch Selbstverdau entstandenes Spaltprodukt handeln.

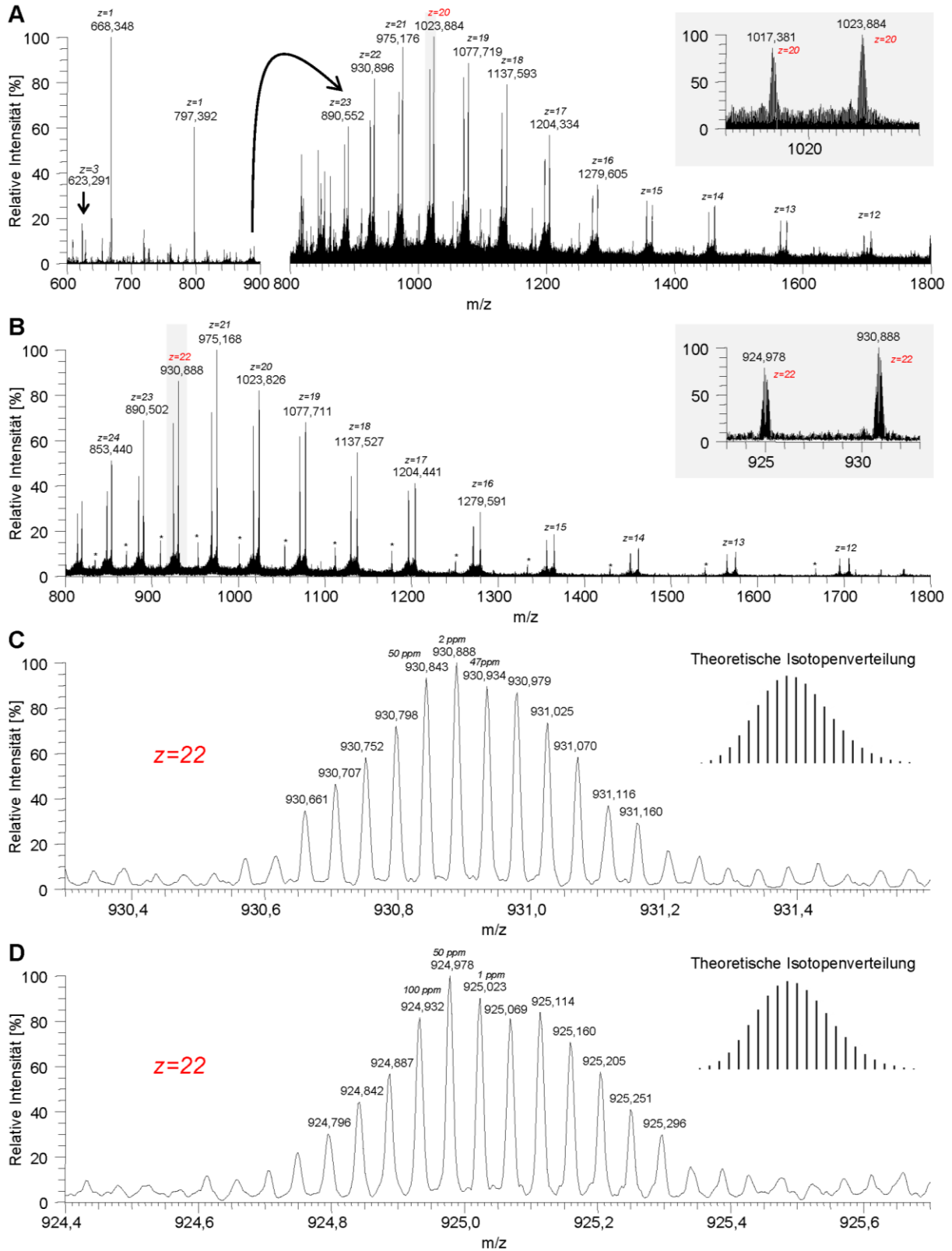


Abb. 30: Legende auf der nächsten Seite.

Abb. 30: MS1-Spektren der Inkubation von rhIL-6 mit Meprin- β . (A) Ergebnis der offline ESI MS Analyse, Spektren akkumuliert von 1,12 bis 7,47 min. (B) Ergebnis der online LC-ESI MS Analyse, Spektren akkumuliert von 40,09 bis 41,41 min. Der Asteriskus kennzeichnet eine Masse, die möglicherweise auf eine Kontamination der Meprin- β Präparation zurückzuführen ist. (C) Ausschnitt des Isotopenmusters von SP1 ($z=22$) der online LC-ESI MS Analyse. (D) Ausschnitt des Isotopenmusters von SP2 ($z=22$) der online LC-ESI MS Analyse. Über den drei intensivsten Isotopensignalen aus (C) und (D) wird die Massenabweichung zum theoretisch intensivsten Isotopensignal der Isotopenverteilung (C, 930,890 m/z , $z=22$; D, 925,024 m/z , $z=22$) in ppm angegeben. Die theoretische Isotopenverteilung wurde mithilfe des Programmes IDCalc berechnet.

Die drei intensivsten in den MS1-Spektren beobachteten Isotopensignale von SP1 bzw. SP2 wurden, wie für rh(P)IL-6 und rh(MAP)IL-6, mit dem jeweils theoretisch intensivsten Isotopensignal der Isotopenverteilung (SP1, 930,890 m/z , $z=22$, Abb. 30C; SP2, 925,024 m/z , $z=22$, Abb. 30D) verglichen. Dabei wurden Massenabweichungen von 50, 2 und 47 ppm (entspricht etwa -1, 0 und +1 Da) für SP1 und von 100, 50 und 1 ppm (entspricht etwa -2, -1 und 0 Da) für SP2 berechnet. Besonders für SP2 ist zu erkennen, dass die experimentell bestimmte Isotopenverteilung hinsichtlich der Intensität einzelner Isotopensignale nicht vollständig mit der theoretischen übereinstimmt, wodurch die Zuordnung des wirklich abundantesten Isotopensignals erschwert wird.

Die Identität der Spaltprodukte SP1 und SP2 wurde zusätzlich durch die manuelle Auswertung der MS2-Spektren bestätigt (SP1, Abb. 31; SP2, Anhang, Abb. A6, S. 147). Hierbei wurden entsprechend dieselben y -Ionen wie für rh(P)IL-6 und rh(MAP)IL-6 sowie eine höhere Anzahl an b -Ionen beobachtet (Übersicht der für SP1 und SP2 identifizierten b - und y -Ionen, Abb. 29, S. 104). Es wurden außerdem Immoniumionen und einige a -Ionen festgestellt. Die Anwesenheit derselben y -Ionen bei rh(P)IL-6, rh(MAP)IL-6, SP1 und SP2 beweist die Proteolyse von rhIL-6 im N-terminalen Bereich. Durch die Hydrolyse mit Meprin- β wurden Pro-3 von rh(P)IL-6 bzw. Pro-5 von rh(MAP)IL-6 entfernt. In der Folge wurden keine internen Fragmente des Typs [P_x - D_y] verzeichnet. Interessanterweise wurden jedoch sowohl für SP1 als auch für SP2 b -Ionen der entsprechenden Asp-Xxx Spaltungen identifiziert. Außerdem wurden für SP1 das b_{51} -Ion und für SP2 sechs b -Ionen von b_{49} bis b_{55} beobachtet, welche die Anwesenheit einer Disulfidbrücke innerhalb der erfassten Aminosäuresequenz bestätigen.

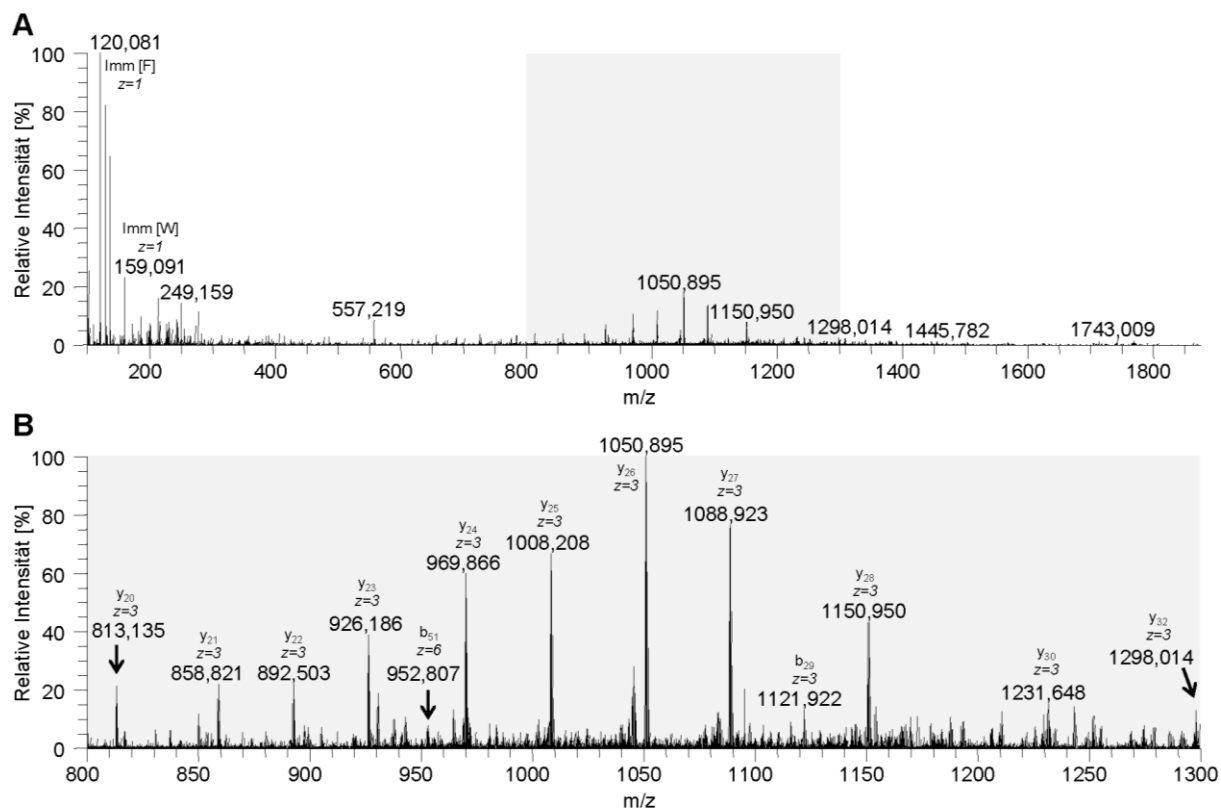


Abb. 31: MS2-Spektrum der online LC-ESI MS Analyse für das durch Meprin- β aus rhIL-6 generierte Spaltprodukt SP1. (B) zeigt einen Ausschnitt von (A). Es ist zu beachten, dass ausschließlich die intensivsten identifizierten Fragmentationen im Spektrum gekennzeichnet wurden.

Betrachtet man nun erneut die für Meprin- α erhaltenen Ergebnisse, so fällt die Anwesenheit eines Signals bei einem m/z -Wert von 930,979 ($z=22$) im MS1-Spektrum der online LC-ESI MS Analyse auf (Abb. 28B, S. 102). Dieses Signal konnte aufgrund der Ergebnisse für Meprin- β dem Spaltprodukt SP1 zugeordnet werden. Außerdem wurde in der offline ESI MS Analyse ein Signal für das SP1 zugehörige, aus der Proteolyse von rh(MAP)IL-6 stammende N-terminale Spaltprodukt MAPVPPG beobachtet (Abb. 28A, links, S. 102). Während auch ein Signal für das für Meprin- β identifizierte N-terminale Spaltprodukt MAPVPPGE mit geringer Intensität in der offline ESI MS Analyse festgestellt werden konnte, wurde kein entsprechendes Signal für das C-terminale Spaltprodukt SP2 detektiert. Damit kann die Anwesenheit der für Meprin- β identifizierten Spaltprodukte auch für das mit Meprin- α inkubierte rhIL-6 vermutet werden. Jedoch deuten die Beobachtungen zusammen mit den bereits geschilderten Ergebnissen für Meprin- α insgesamt darauf hin, dass rhIL-6 zu einem vergleichsweise geringen Anteil und weniger spezifisch von der Protease prozessiert wurde.

Ergebnisse aus SDS-PAGE Analysen, die von Felix Jäckle (Forschungsprojekt A9, SFB 877) durchgeführt wurden, stimmen mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit überein. Hierbei wurde die durch Meprin- α/β vermittelte Proteolyse von rhIL-6 zu jeweils drei Zeitpunkten (30 min, 1 h und 2 h) der Inkubation untersucht, während in der vorliegenden Arbeit ausschließlich eine Inkubationsdauer von 30 min analysiert wurde. Auf dem Gel wurde für Meprin- β bereits nach 30 min lediglich eine Bande mit einem im Vergleich zum intakten Substrat rhIL-6 nur wenig verringerten Molekulargewicht beobachtet. Diese Bande beinhaltete mit großer Wahrscheinlichkeit die Spaltprodukte SP1 und SP2 und lag auch nach 2 h Inkubationsdauer noch größtenteils definiert vor. Demgegenüber wurde für Meprin- α nach 30 min eine Bande auf derselben Höhe von rhIL-6 festgestellt. Nach 1 h Inkubationsdauer nahm die Intensität dieser Bande ab; nach 2 h konnte ausschließlich ein Schatten auf dem Gel verzeichnet werden. Im Vergleich zu Meprin- β wurden keine definierten Banden für entstehende Spaltprodukte beobachtet. Dies stützt die hier erhaltenen Ergebnisse im Hinblick auf eine eher unspezifische Hydrolyse von rhIL-6 durch die Protease Meprin- α . Es ist zu beachten, dass SDS-PAGE Analysen lediglich einen Überblick über die proteolytische Reaktion liefern können, während massenspektrometrische Methoden eine molekulare Charakterisierung der Analyten erlauben.

Neben der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen *Top-down* Analyse zur Ermittlung der Meprin- α/β Spaltstellen in rhIL-6 wurden von Dr. Tomas Koudelka (Arbeitsgruppe „Systematische Proteomforschung und Bioanalytik“, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) alternative, auf dem *Bottom-up* Prinzip basierende Strategien angewendet.

Zum einen sollte im Anschluss an eine SDS-PAGE Analyse von mit Meprin- β inkubiertem rhIL-6 ein chymotryptischer In-Gel-Verdau sowohl des intakten Substrates als auch des beobachteten Spaltproduktes durchgeführt werden. Anhand der LC-ESI MS Analyse wurde auf eine Hydrolyse von rhIL-6 im N-terminalen Bereich, mit großer Wahrscheinlichkeit zwischen Gly-5 und Glu-6, Glu-6 und Asp-7 oder Lys-9 und Asp-10 (Nummerierung bezieht sich auf rh(P)IL-6), geschlossen. Es wurden jedoch weitere Untersuchungen empfohlen.

Mithilfe von ATOMS (S. 18) [89] sollten zudem sowohl die durch Meprin- α als auch die durch Meprin- β generierten Spaltstellen identifiziert werden. Mit dem Ergebnis, dass für Meprin- β neben der Hydrolyse im N-terminalen Bereich weitere Spaltstellen im C-

terminalen Bereich vermutet wurden. Für Meprin- α waren die Ergebnisse nicht eindeutig. In der Folge wurden *Top-down* Analysen der Proben vorgeschlagen.

Größtenteils stimmen die durch den In-Gel-Verdau bzw. durch ATOMS erhaltenen Ergebnisse mit denen der hier vorliegenden *Top-down* Untersuchung überein. Es konnte jedoch klar gezeigt werden, dass bei der Inkubation mit Meprin- β hauptsächlich die Spaltprodukte SP1 und SP2 entstehen, während für Meprin- α insgesamt nur wenig Spaltvorgänge beobachtet werden konnten. Grundsätzlich erlauben *Top-down* Analysen im Gegensatz zu den beschriebenen *Bottom-up* Strategien eine direkte Identifizierung von Spaltstellen und bedürfen außerdem keiner langwierigen und aufwändigen Probenvorbereitung.

Die Spaltspezifitäten der Proteasen Meprin- α und Meprin- β wurden vorhergehend anhand einer synthetischen Peptid-Zufallsbibliothek [223] sowie in einer umfassenden Studie mithilfe von PICS und TAILS untersucht [70].

In der ersten Studie wurde die Spaltspezifität der beiden Proteasen hinsichtlich der P1' bis P4' Sequenz mithilfe von Edman-Sequenzierung der entstandenen Spaltprodukte bestimmt [223]. Demnach zieht Meprin- β die Hydrolyse von Peptidbindungen mit Asparaginsäure und zu einem geringeren Ausmaß Glutaminsäure an P1' vor, während für die folgenden Positionen keine signifikanten Präferenzen festgestellt werden konnten. Für Meprin- α wurde demgegenüber keine bevorzugte Hydrolyse von Peptidbindungen mit sauren Aminosäuren an P1' beobachtet. An dieser Position wurden eher kleine (z. B. Serin oder Alanin) oder aromatische (z. B. Phenylalanin oder Tyrosin) Aminosäuren identifiziert. Diese Ergebnisse stimmen mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Spaltvorgängen der beiden Proteasen überein. Während für Meprin- α die Anwesenheit einer erhöhten Anzahl von aus der Hydrolyse von rhIL-6 stammenden Spaltprodukten vermutet wurde, wurden für Meprin- β ausschließlich zwei Spaltstellen beobachtet. Beide beinhalten saure Aminosäuren an P1' Position: (i) PVPPG⁵ ↓ ⁶EDSKD und (ii) VPPGE⁶ ↓ ⁷DSKDV (Nummerierung bezieht sich auf rh(P)IL-6).

Zudem wurden anhand proteombasierter Peptidbibliotheken Spaltspezifitätsprofile der beiden Proteasen mithilfe der PICS Strategie (S. 15) [69] erstellt [70]. Für Meprin- β wurde das bevorzugte Auftreten von Asparaginsäure, gefolgt von Glutaminsäure, an P1' festgestellt, während für Meprin- α eine vergleichsweise breite Spaltspezifität beobachtet wurde.

In der TAILS Strategie (S. 18) [88] werden native Proteine mit der *Target* Protease inkubiert. Die Methode erlaubt die gleichzeitige Identifizierung von Substraten und zugehörigen Spaltstellen. Interessanterweise wurde anhand von TAILS, wenn auch nicht so ausgeprägt wie für Meprin- β , eine erhöhte Präferenz von Meprin- α für saure Aminosäuren an P1' gezeigt [70]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden Spaltstellen mit sauren Aminosäuren an P1', wie PVPPG⁵ ↓ ⁶EDSKD, für Meprin- α beobachtet.

Wie bereits erwähnt, wurde kürzlich eine Inaktivierung von IL-6 durch Meprin- α und Meprin- β beschrieben [214]. Die Autoren berichteten von einer Meprin- α Spaltstelle im C-terminalen Bereich des Substrates. Rekombinantes murines Meprin- α wurde hierfür mit rekombinantem humanem IL-6 inkubiert, ein SDS-PAGE Gel angefertigt, relevante Banden ausgeschnitten und mittels In-Gel-Verdau und MALDI MS analysiert. Aufgrund der massenspektrometrisch erhaltenen Sequenzabdeckung wurde auf eine Hydrolyse im C-terminalen Bereich des Substrates geschlossen. Jedoch konnte die genaue Position der Spaltstelle nicht ermittelt werden. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen eindeutig eine Hydrolyse von rhIL-6 im N-terminalen Bereich durch Meprin- β . Hingegen wurde für Meprin- α keine signifikante Prozessierung des Substrates beobachtet. Diese konträren Daten resultieren möglicherweise aus der Verwendung unterschiedlicher Inkubationsprotokolle, beispielsweise hinsichtlich der Inkubationsdauer, oder verschiedener Konstrukte von Meprin- α .

Zusammenfassend konnte die *Top-down* Massenspektrometrie in der vorliegenden Arbeit erfolgreich zur Analyse von proteolytischen Spaltstellen eingesetzt werden. Für Meprin- β wurden demnach zwei Spaltstellen im N-terminalen Bereich von rhIL-6 identifiziert: (i) PVPPG⁵ ↓ ⁶EDSKD und (ii) VPPGE⁶ ↓ ⁷DSKDV (Nummerierung bezieht sich auf rh(P)IL-6). Hingegen wurden für Meprin- α nur wenige und eher unspezifische Spaltvorgänge beobachtet. Es ist zu beachten, dass es sich hierbei um die Ergebnisse einer *in vitro* durchgeführten Reaktion handelt. Die Proteasen und auch das Substrat wurden rekombinant hergestellt und aufgereinigt, wodurch die natürlichen *in vivo* vorherrschenden Bedingungen nicht gegeben sind. Dies schließt auch die Anwesenheit möglicher relevanter Interaktionspartner von Meprin- α und Meprin- β aus.

Es wurden zwei analytische Strategien miteinander verglichen, *offline* ESI MS und *online* LC-ESI MS, wobei für beide gewisse Vor- und Nachteile festgestellt werden konnten. Für

die *online* LC-ESI MS Analyse war aufgrund der Verwendung einer Vorsäule keine zusätzliche Probenvorbereitung nötig, während die Proben vor der *offline* ESI MS Analyse mittels Festphasenextraktion aufgereinigt wurden. Zudem wurde bei der *online* LC-ESI MS Analyse ein deutlich verringertes Hintergrundrauschen und damit eine höhere Qualität der MS1-Spektren verzeichnet. Jedoch können MS Daten im Fall einer *offline* ESI MS Analyse über einen längeren Zeitraum aufgezeichnet werden. Bei der zweiten Strategie ist dies nur während der Elution der Analyten möglich. Außerdem kann die *online* LC-ESI MS Analyse, wie es in der vorliegenden Arbeit im Hinblick auf die N-terminalen Spaltprodukte beobachtet wurde, zu einem Informationsverlust führen. Dieser ist möglicherweise auf eine zu geringe Retention von vergleichsweise kleinen Analyten durch die Vorsäule zurückzuführen. Bei der *offline* ESI MS Analyse gelangen theoretisch alle in der Probe enthaltenen Analyten in das Massenspektrometer und können potentiell detektiert werden. MS2-Spektren der beiden Strategien waren von vergleichbarer Qualität.

7.4 Ausblick

In der vorhergehend beschriebenen Studie wurde die *Top-down* Massenspektrometrie, sowohl im Sinne einer *offline* ESI MS als auch *online* LC-ESI MS Analyse, zur Identifizierung von Meprin- α/β Spaltstellen in rhIL-6 verwendet.

Grundsätzlich ermöglicht ein *Top-down* Ansatz aufgrund hundertprozentiger Sequenzabdeckung eine direkte Zuordnung von proteolytischen Spaltprodukten und damit einhergehend von zugehörigen Spaltstellen. Demnach ist dieser Ansatz im Vergleich zu einer *Bottom-up* Strategie besonders gut für Fragestellungen dieser Art geeignet und könnte auf nahezu jedes beliebige Protease-Substrat-Paar angewendet werden. Dabei können Substrate von bis zu 25 kDa routinemäßig untersucht werden [155]. Zur *Top-down* Massenspektrometrie von Analyten höheren Molekulargewichtes müssten möglicherweise zunächst methodische Optimierungen vorgenommen werden. An dieser Stelle wäre beispielsweise die Verwendung von ladungsreduzierenden Reagenzien zu erwähnen [177,178].

Um die Qualität der MS2-Spektren von rhIL-6 und den aus der Proteolyse resultierenden Spaltprodukten weiter zu verbessern, könnte zum einen die Reduktion der zwei vorhandenen Disulfidbrücken vor der MS Messung hilfreich sein, welche unter anderem für die

geringe Ausbeute an b-Ionen verantwortlich sein könnten. Darüber hinaus könnte ETD [58,59] als alternative Fragmentierungstechnik zu HCD eingesetzt werden. Beide Strategien könnten möglicherweise auch die *Top-down* Analyse anderer Substrate als rhIL-6 unterstützen.

Die Bedingungen zur chromatographischen Trennung in einer *online* LC-ESI MS sollten grundsätzlich zunächst optimiert werden, um eine Koelution von enthaltenen Analyten zu vermeiden. Hierbei könnten unter anderem verschiedene stationäre Phasen, Eluenten, Gradienten oder Säulenofentemperaturen eingesetzt werden. Die Analyten rh(P)IL-6, rh(MAP)IL-6, SP1 und SP2 konnten auch unter Verwendung verschiedener Gradienten nicht voneinander getrennt werden. Dies war mit großer Wahrscheinlichkeit dadurch bedingt, dass sich die vier Proteinvarianten jeweils nur um wenige Aminosäuren voneinander unterscheiden. Wäre eine vollständige chromatographische Trennung gelungen, wäre das vermutlich der Qualität der MS Daten zugute gekommen.

Bezogen auf die Ergebnisse für Meprin- β und rhIL-6 stellt sich die Frage, ob die Identität der Substratvariante die Position der Spaltstelle beeinflusst. Beispielsweise wäre es interessant zu untersuchen, ob die Peptidbindung im Falle von rh(P)IL-6 vornehmlich zwischen Gly-5 und Glu-6 oder zwischen Glu-6 und Asp-7 hydrolysiert wird.

Zeitabhängige LC-MS Analysen, wie in Kapitel 6 dieser Arbeit gezeigt wurde, könnten Aufschluss darüber geben, ob die Spaltung zwischen Gly-5 und Glu-6 gegenüber der zwischen Glu-6 und Asp-7 kinetisch bevorzugt wird. Außerdem könnte durch die Analyse mehrerer Zeitpunkte der proteasekatalysierten Reaktion die Stabilität der Spaltprodukte SP1 und SP2 gegenüber der Protease Meprin- β festgestellt werden.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. & Deshpande, V.V. (1998) *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*. Microbiol Mol Biol Rev, 62, 597–635.
- [2] Schaller, A. (2004) *A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases*. Planta, 220, 183–97.
- [3] Kaman, W.E., Hays, J.P., Endtz, H.P. & Bikker, F.J. (2014) *Bacterial proteases: targets for diagnostics and therapy*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 33, 1081–7.
- [4] Yike, I. (2011) *Fungal proteases and their pathophysiological effects*. Mycopathologia, 171, 299–323.
- [5] Verdaguer, N., Ferrero, D. & Murthy, M.R.N. (2014) *Viruses and viral proteins*. IUCr], 1, 492–504.
- [6] Puente, X.S., Sánchez, L.M., Overall, C.M. & López-Otín, C. (2003) *Human and mouse proteases: a comparative genomic approach*. Nat Rev Genet, 4, 544–58.
- [7] Weber, S. & Saftig, P. (2012) *Ectodomain shedding and ADAMs in development*. Development, 139, 3693–709.
- [8] Dahlbäck, B. (2000) *Blood coagulation*. Lancet, 355, 1627–32.
- [9] Gray, G.M. & Cooper, H.L. (1971) *Protein digestion and absorption*. Gastroenterology, 61, 535–44.
- [10] Gluschkof, P. & Cohen, P. (1987) *Proteolytic enzymes in the post-translational processing of polypeptide hormone precursors*. Neurochem Res, 12, 951–8.
- [11] Heutinck, K.M., ten Berge, I.J.M., Hack, C.E., Hamann, J. & Rowshani, A.T. (2010) *Serine proteases of the human immune system in health and disease*. Mol Immunol, 47, 1943–55.
- [12] Cohen, G.M. (1997) *Caspases: the executioners of apoptosis*. Biochem J, 326, 1–16.
- [13] Turk, B. (2006) *Targeting proteases: successes, failures and future prospects*. Nat Rev Drug Discov, 5, 785–99.
- [14] Cunningham, R.E. (2010) *Tissue disaggregation*. Methods Mol Biol, 588, 327–30.
- [15] Switzar, L., Giera, M. & Niessen, W.M.A. (2013) *Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments*. J Proteome Res, 12, 1067–77.
- [16] Feijoo-Siota, L. & Villa, T. (2011) *Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications*. Food Bioprocess Technol, 4, 1066–88.
- [17] Saeki, K., Ozaki, K., Kobayashi, T. & Ito, S. (2007) *Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures*. J Biosci Bioeng, 103, 501–8.
- [18] Webb, E.C. (1992) *Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes*. Academic Press, San Diego, CA.
- [19] Carter, P. & Wells, J.A. (1988) *Dissecting the catalytic triad of a serine protease*. Nature, 332, 564–8.

- [20] Overall, C.M. & Blobel, C.P. (2007) *In search of partners: linking extracellular proteases to substrates*. Nat Rev Mol Cell Biol, 8, 245–57.
- [21] Belitz, H.-D., Grosch, W. & Schieberle, P. (2008) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- [22] Schechter, I. & Berger, A. (1967) *On the size of the active site in proteases. I. Papain*. Biochem Biophys Res Commun, 27, 157–62.
- [23] Overall, C.M. & Kleifeld, O. (2006) *Tumour microenvironment — Opinion: Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 6, 227–39.
- [24] Becker-Pauly, C., Broder, C., Prox, J., Koudelka, T. & Tholey, A. (2014) *Mapping orphan proteases by proteomics: meprin metalloproteases deciphered as potential therapeutic targets*. Proteomics Clin Appl, 8, 382–8.
- [25] Khan, A.R. & James, M.N. (1998) *Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes*. Protein Sci, 7, 815–36.
- [26] Anders, A., Gilbert, S., Garten, W., Postina, R. & Fahrenholz, F. (2001) *Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases*. FASEB J, 15, 1837–9.
- [27] Jefferson, T., Auf dem Keller, U., Bellac, C., Metz, V.V., Broder, C., Hedrich, J., Ohler, A., Maier, W., Magdolen, V., Sterchi, E., Bond, J.S., Jayakumar, A., Traupe, H., Chalaris, A., Rose-John, S., Pietrzik, C.U., Postina, R., Overall, C.M. & Becker-Pauly, C. (2013) *The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin β and ADAM10*. Cell Mol Life Sci, 70, 309–33.
- [28] López-Otín, C. & Bond, J.S. (2008) *Proteases: multifunctional enzymes in life and disease*. J Biol Chem, 283, 30433–7.
- [29] Pruessmeyer, J. & Ludwig, A. (2009) *The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer*. Semin Cell Dev Biol, 20, 164–74.
- [30] Rodriguez, J., Gupta, N., Smith, R.D. & Pevzner, P.A. (2008) *Does trypsin cut before proline?* J Proteome Res, 7, 300–5.
- [31] O'Brien, R.J. & Wong, P.C. (2011) *Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease*. Annu Rev Neurosci, 34, 185–204.
- [32] Zhang, H., Ma, Q., Zhang, Y. & Xu, H. (2012) *Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein*. J Neurochem, 120 Suppl 1, 9–21.
- [33] Prox, J., Willenbrock, M., Weber, S., Lehmann, T., Schmidt-Arras, D., Schwanbeck, R., Saftig, P. & Schwake, M. (2012) *Tetraspanin15 regulates cellular trafficking and activity of the ectodomain sheddase ADAM10*. Cell Mol Life Sci, 69, 2919–32.
- [34] Amour, A., Knight, C.G., Webster, A., Slocombe, P.M., Stephens, P.E., Knäuper, V., Docherty, A.J. & Murphy, G. (2000) *The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3*. FEBS Lett, 473, 275–9.
- [35] Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J. & Bateman, A. (2014) *MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors*. Nucleic Acids Res, 42, D503–9.

- [36] Schwarz, J., Schmidt, S., Will, O., Koudelka, T., Köhler, K., Boss, M., Rabe, B., Tholey, A., Scheller, J., Schmidt-Arras, D., Schwake, M., Rose-John, S. & Chalaris, A. (2014) *Polo-like kinase 2, a novel ADAM17 signaling component, regulates tumor necrosis factor α ectodomain shedding*. J Biol Chem, 289, 3080–93.
- [37] Venne, A.S., Kollipara, L. & Zahedi, R.P. (2014) *The next level of complexity: crosstalk of posttranslational modifications*. Proteomics, 14, 513–24.
- [38] Düsterhöft, S., Jung, S., Hung, C.-W., Tholey, A., Sönnichsen, F.D., Grötzinger, J. & Lorenzen, I. (2013) *Membrane-proximal domain of a disintegrin and metalloprotease-17 represents the putative molecular switch of its shedding activity operated by protein-disulfide isomerase*. J Am Chem Soc, 135, 5776–81.
- [39] Matthews, D.J. & Wells, J.A. (1993) *Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display*. Science, 260, 1113–7.
- [40] Ratnikov, B., Cieplak, P. & Smith, J.W. (2009) *High throughput substrate phage display for protease profiling*. Methods Mol Biol, 539, 93–114.
- [41] Rano, T.A., Timkey, T., Peterson, E.P., Rotonda, J., Nicholson, D.W., Becker, J.W., Chapman, K.T. & Thornberry, N.A. (1997) *A combinatorial approach for determining protease specificities: application to interleukin-1 β converting enzyme (ICE)*. Chem Biol, 4, 149–55.
- [42] Turk, B.E., Huang, L.L., Piro, E.T. & Cantley, L.C. (2001) *Determination of protease cleavage site motifs using mixture-based oriented peptide libraries*. Nat Biotechnol, 19, 661–7.
- [43] Schneider, E.L. & Craik, C.S. (2009) *Positional scanning synthetic combinatorial libraries for substrate profiling*. Methods Mol Biol, 539, 59–78.
- [44] Diamond, S.L. (2007) *Methods for mapping protease specificity*. Curr Opin Chem Biol, 11, 46–51.
- [45] McQuibban, G.A., Gong, J.H., Tam, E.M., McCulloch, C.A., Clark-Lewis, I. & Overall, C.M. (2000) *Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3*. Science, 289, 1202–6.
- [46] Granelli-Piperno, A. & Reich, E. (1978) *A study of proteases and protease-inhibitor complexes in biological fluids*. J Exp Med, 148, 223–34.
- [47] Leber, T.M. & Balkwill, F.R. (1997) *Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels*. Anal Biochem, 249, 24–8.
- [48] Sanman, L.E. & Bogyo, M. (2014) *Activity-based profiling of proteases*. Annu Rev Biochem, 83, 249–73.
- [49] Wilkins, M. & Appel, R. (2007) *Ten Years of the Proteome*. In: Proteome Research. Springer, Berlin, Heidelberg. 1–13.
- [50] Tyers, M. & Mann, M. (2003) *From genomics to proteomics*. Nature, 422, 193–7.
- [51] López-Otín, C. & Overall, C.M. (2002) *Protease degradomics: a new challenge for proteomics*. Nat Rev Mol Cell Biol, 3, 509–19.
- [52] Aebersold, R., Burlingame, A.L. & Bradshaw, R.A. (2013) *Western blots versus selected reaction monitoring assays: time to turn the tables?*. Mol Cell Proteomics, 12, 2381–2.

- [53] Karas, M. & Hillenkamp, F. (1988) *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Anal Chem, 60, 2299–301.
- [54] Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T. & Matsuo, 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, 151–3.
- [55] Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. & Whitehouse, C.M. (1989) *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science, 246, 64–71.
- [56] Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M. & Graham Cooks, R. (2005) *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. J Mass Spectrom, 40, 430–43.
- [57] Scigelova, M. & Makarov, A. (2006) *Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics*. Proteomics, 6 Suppl 2, 16–21.
- [58] Syka, J.E.P., Coon, J.J., Schroeder, M.J., Shabanowitz, J. & Hunt, D.F. (2004) *Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry*. Proc Natl Acad Sci USA, 101, 9528–33.
- [59] Mikesch, L.M., Ueberheide, B., Chi, A., Coon, J.J., Syka, J.E.P., Shabanowitz, J. & Hunt, D.F. (2006) *The utility of ETD mass spectrometry in proteomic analysis*. Biochim Biophys Acta, 1764, 1811–22.
- [60] Kelleher, N.L., Lin, H.Y., Valaskovic, G.A., Aaserud, D.J., Fridriksson, E.K. & McLafferty, F.W. (1999) *Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry*. J Am Chem Soc, 121, 806–12.
- [61] Washburn, M.P., Wolters, D. & Yates, J.R. (2001) *Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology*. Nat Biotechnol, 19, 242–7.
- [62] Klose, J. (1975) *Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals*. Humangenetik, 26, 231–43.
- [63] O'Farrell, P.H. (1975) *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J Biol Chem, 250, 4007–21.
- [64] Unlü, M., Morgan, M.E. & Minden, J.S. (1997) *Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts*. Electrophoresis, 18, 2071–7.
- [65] Agard, N.J. & Wells, J.A. (2009) *Methods for the proteomic identification of protease substrates*. Curr Opin Chem Biol, 13, 503–9.
- [66] Impens, F., Colaert, N., Helsens, K., Plasman, K., Van Damme, P., Vandekerckhove, J. & Gevaert, K. (2010) *MS-driven protease substrate degradomics*. Proteomics, 10, 1284–96.
- [67] Van den Berg, B.H. & Tholey, A. (2012) *Mass spectrometry-based proteomics strategies for protease cleavage site identification*. Proteomics, 12, 516–29.
- [68] Huesgen, P.F. & Overall, C.M. (2012) *N- and C-terminal degradomics: new approaches to reveal biological roles for plant proteases from substrate identification*. Physiol Plant, 145, 5–17.
- [69] Schilling, O. & Overall, C.M. (2008) *Proteome-derived, database-searchable peptide libraries for identifying protease cleavage sites*. Nat Biotechnol, 26, 685–94.

- [70] Becker-Pauly, C., Barre, O., Schilling, O., Auf dem Keller, U., Ohler, A., Broder, C., Schutte, A., Kappelhoff, R., Stocker, W. & Overall, C.M. (2011) *Proteomic analyses reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological substrates*. Mol Cell Proteomics, 10, M111 009233.
- [71] Biniossek, M.L., Nägler, D.K., Becker-Pauly, C. & Schilling, O. (2011) *Proteomic identification of protease cleavage sites characterizes prime and non-prime specificity of cysteine cathepsins B, L, and S*. J Proteome Res, 10, 5363–73.
- [72] Zelanis, A., Huesgen, P.F., Oliveira, A.K., Tashima, A.K., Serrano, S.M.T. & Overall, C.M. (2015) *Snake venom serine proteinases specificity mapping by proteomic identification of cleavage sites*. J Proteomics, 113, 260–7.
- [73] Marino, G., Huesgen, P.F., Eckhard, U., Overall, C.M., Schröder, W.P. & Funk, C. (2014) *Family-wide characterization of matrix metalloproteinases from Arabidopsis thaliana reveals their distinct proteolytic activity and cleavage site specificity*. Biochem J, 457, 335–46.
- [74] Jakoby, T., van den Berg, B.H. & Tholey, A. (2012) *Quantitative protease cleavage site profiling using tandem-mass-tag labeling and LC-MALDI-TOF/TOF MS/MS analysis*. J Proteome Res, 11, 1812–20.
- [75] Mahrus, S., Trinidad, J.C., Barkan, D.T., Sali, A., Burlingame, A.L. & Wells, J.A. (2008) *Global sequencing of proteolytic cleavage sites in apoptosis by specific labeling of protein N termini*. Cell, 134, 866–76.
- [76] Gevaert, K., Goethals, M., Martens, L., Van Damme, J., Staes, A., Thomas, G.R. & Vandekerckhove, J. (2003) *Exploring proteomes and analyzing protein processing by mass spectrometric identification of sorted N-terminal peptides*. Nat Biotechnol, 21, 566–9.
- [77] Staes, A., Van Damme, P., Helsens, K., Demol, H., Vandekerckhove, J. & Gevaert, K. (2008) *Improved recovery of proteome-informative, protein N-terminal peptides by combined fractional diagonal chromatography (COFRADIC)*. Proteomics, 8, 1362–70.
- [78] Staes, A., Impens, F., Van Damme, P., Ruttens, B., Goethals, M., Demol, H., Timmerman, E., Vandekerckhove, J. & Gevaert, K. (2011) *Selecting protein N-terminal peptides by combined fractional diagonal chromatography*. Nat Protoc, 6, 1130–41.
- [79] Van Damme, P., Maurer-Stroh, S., Hao, H., Colaert, N., Timmerman, E., Eisenhaber, F., Vandekerckhove, J. & Gevaert, K. (2010) *The substrate specificity profile of human granzyme A*. Biol Chem, 391, 983–97.
- [80] Van Damme, P., Maurer-Stroh, S., Plasman, K., Van Durme, J., Colaert, N., Timmerman, E., De Bock, P.-J., Goethals, M., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Vandekerckhove, J. & Gevaert, K. (2009) *Analysis of protein processing by N-terminal proteomics reveals novel species-specific substrate determinants of granzyme B orthologs*. Mol Cell Proteomics, 8, 258–72.

- [81] Ong, S.-E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A. & Mann, M. (2002) *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics*. *Mol Cell Proteomics*, 1, 376–86.
- [82] Gevaert, K., Staes, A., Van Damme, J., De Groot, S., Hugelier, K., Demol, H., Martens, L., Goethals, M. & Vandekerckhove, J. (2005) *Global phosphoproteome analysis on human HepG2 hepatocytes using reversed-phase diagonal LC*. *Proteomics*, 5, 3589–99.
- [83] Ghesquière, B., Van Damme, J., Martens, L., Vandekerckhove, J. & Gevaert, K. (2006) *Proteome-wide characterization of N-glycosylation events by diagonal chromatography*. *J Proteome Res*, 5, 2438–47.
- [84] Stes, E., Laga, M., Walton, A., Samyn, N., Timmerman, E., De Smet, I., Goormachtig, S. & Gevaert, K. (2014) *A COFRADIC protocol to study protein ubiquitination*. *J Proteome Res*, 13, 3107–13.
- [85] Venne, A.S., Vögtle, F.-N., Meisinger, C., Sickmann, A. & Zahedi, R.P. (2013) *Novel highly sensitive, specific, and straightforward strategy for comprehensive N-terminal proteomics reveals unknown substrates of the mitochondrial peptidase Icp55*. *J Proteome Res*, 12, 3823–30.
- [86] Xu, G., Shin, S.B. & Jaffrey, S.R. (2009) *Global profiling of protease cleavage sites by chemoselective labeling of protein N-termini*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 19310–5.
- [87] Edman, P. (1956) *Mechanism of the Phenyl Isothiocyanate Degradation of Peptides*. *Nature*, 177, 667–8.
- [88] Kleifeld, O., Doucet, A., auf dem Keller, U., Prudova, A., Schilling, O., Kainthan, R.K., Starr, A.E., Foster, L.J., Kizhakkedathu, J.N. & Overall, C.M. (2010) *Isotopic labeling of terminal amines in complex samples identifies protein N-termini and protease cleavage products*. *Nat Biotechnol*, 28, 281–8.
- [89] Doucet, A. & Overall, C.M. (2011) *Broad coverage identification of multiple proteolytic cleavage site sequences in complex high molecular weight proteins using quantitative proteomics as a complement to edman sequencing*. *Mol Cell Proteomics*, 10, M110.003533.
- [90] Prudova, A., auf dem Keller, U., Butler, G.S. & Overall, C.M. (2010) *Multiplex N-terminome analysis of MMP-2 and MMP-9 substrate degradomes by iTRAQ-TAILS quantitative proteomics*. *Mol Cell Proteomics*, 9, 894–911.
- [91] Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlett-Jones, M., He, F., Jacobson, A. & Pappin, D.J. (2004) *Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents*. *Mol Cell Proteomics*, 3, 1154–69.
- [92] Xu, G., Shin, S.B.Y. & Jaffrey, S.R. (2011) *Chemoenzymatic labeling of protein C-termini for positive selection of C-terminal peptides*. *ACS Chem Biol*, 6, 1015–20.

- [93] Van Damme, P., Staes, A., Bronsoms, S., Helsens, K., Colaert, N., Timmerman, E., Aviles, F.X., Vandekerckhove, J. & Gevaert, K. (2010) *Complementary positional proteomics for screening substrates of endo- and exoproteases*. Nat Methods, 7, 512–5.
- [94] Schilling, O., Barre, O., Huesgen, P.F. & Overall, C.M. (2010) *Proteome-wide analysis of protein carboxy termini: C terminomics*. Nat Methods, 7, 508–11.
- [95] Viswanathan, S., Unlü, M. & Minden, J.S. (2006) *Two-dimensional difference gel electrophoresis*. Nat Protoc, 1, 1351–8.
- [96] Bode, W., Gomis-Rüth, F.X. & Stöckler, W. (1993) *Astacins, serralyins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins.”* FEBS Lett, 331, 134–40.
- [97] Stone, A.L., Kroeger, M. & Sang, Q.X. (1999) *Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins (review)*. J Protein Chem, 18, 447–65.
- [98] Huxley-Jones, J., Clarke, T.-K., Beck, C., Toubaris, G., Robertson, D.L. & Boot-Handford, R.P. (2007) *The evolution of the vertebrate metzincins; insights from Ciona intestinalis and Danio rerio*. BMC Evol Biol, 7, 63.
- [99] Edwards, D.R., Handsley, M.M. & Pennington, C.J. (2008) *The ADAM metalloproteinases*. Mol Aspects Med, 29, 258–89.
- [100] Shinde, U.P., Liu, J.J. & Inouye, M. (1997) *Protein memory through altered folding mediated by intramolecular chaperones*. Nature, 389, 520–2.
- [101] Leonard, J.D., Lin, F. & Milla, M.E. (2005) *Chaperone-like properties of the prodomain of TNFalpha-converting enzyme (TACE) and the functional role of its cysteine switch*. Biochem J, 387, 797–805.
- [102] Suh, J., Choi, S.H., Romano, D.M., Gannon, M.A., Lesinski, A.N., Kim, D.Y. & Tanzi, R.E. (2013) *ADAM10 missense mutations potentiate beta-amyloid accumulation by impairing prodomain chaperone function*. Neuron, 80, 385–401.
- [103] Loechel, F., Overgaard, M.T., Oxvig, C., Albrechtsen, R. & Wewer, U.M. (1999) *Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain. Evidence for a functional cysteine switch*. J Biol Chem, 274, 13427–33.
- [104] Janes, P.W., Saha, N., Barton, W.A., Kolev, M.V., Wimmer-Kleikamp, S.H., Nievergall, E., Blobel, C.P., Himanen, J.-P., Lackmann, M. & Nikolov, D.B. (2005) *Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans*. Cell, 123, 291–304.
- [105] Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A. & Israel, A. (2000) *A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE*. Mol Cell, 5, 207–16.
- [106] Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lübke, T., Lena Illert, A., von Figura, K. & Saftig, P. (2002) *The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts*. Hum Mol Genet, 11, 2615–24.

- [107] Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.-M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P. & Blobel, C.P. (2004) *Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands*. *J Cell Biol*, 164, 769–79.
- [108] Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D. & Saftig, P. (2005) *ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling*. *EMBO J*, 24, 742–52.
- [109] Herren, B., Levkau, B., Raines, E.W. & Ross, R. (1998) *Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases*. *Mol Biol Cell*, 9, 1589–601.
- [110] Schulz, B., Pruessmeyer, J., Maretzky, T., Ludwig, A., Blobel, C.P., Saftig, P. & Reiss, K. (2008) *ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin*. *Circ Res*, 102, 1192–201.
- [111] Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J. & Cerretti, D.P. (1997) *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells*. *Nature*, 385, 729–33.
- [112] Moss, M.L., Jin, S.L., Milla, M.E., Bickett, D.M., Burkhart, W., Carter, H.L., Chen, W.J., Clay, W.C., Didsbury, J.R., Hassler, D., Hoffman, C.R., Kost, T.A., Lambert, M.H., Leesnitzer, M.A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., Overton, L.K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J.L. & Becherer, J.D. (1997) *Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha*. *Nature*, 385, 733–6.
- [113] Rosendahl, M.S., Ko, S.C., Long, D.L., Brewer, M.T., Rosenzweig, B., Hedl, E., Anderson, L., Pyle, S.M., Moreland, J., Meyers, M.A., Kohno, T., Lyons, D. & Lichenstein, H.S. (1997) *Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor-alpha-processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases*. *J Biol Chem*, 272, 24588–93.
- [114] Saftig, P. & Reiss, K. (2011) *The “A Disintegrin And Metalloproteases” ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential?*. *Eur J Cell Biol*, 90, 527–35.
- [115] Mohan, M.J., Seaton, T., Mitchell, J., Howe, A., Blackburn, K., Burkhart, W., Moyer, M., Patel, I., Waitt, G.M., Becherer, J.D., Moss, M.L. & Milla, M.E. (2002) *The tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity*. *Biochemistry*, 41, 9462–9.
- [116] Jin, G., Huang, X., Black, R., Wolfson, M., Rauch, C., McGregor, H., Ellestad, G. & Cowling, R. (2002) *A continuous fluorimetric assay for tumor necrosis factor-alpha converting enzyme*. *Anal Biochem*, 302, 269–75.
- [117] Lambert, M.H., Blackburn, R.K., Seaton, T.D., Kassel, D.B., Kinder, D.S., Leesnitzer, M.A., Bickett, D.M., Warner, J.R., Andersen, M.W., Badiang, J.G., Cowan, D.J., Gaul, M.D., Petrov, K.G., Rabinowitz, M.H., Wiethe, R.W., Becherer, J.D., McDougald, D.L., Musso, D.L., Andrews, R.C. & Moss, M.L. (2005) *Substrate specificity and novel selective inhibitors of TNF-alpha converting enzyme (TACE) from two-dimensional substrate mapping*. *Comb Chem High Throughput Screen*, 8, 327–39.

- [118] Caescu, C.I., Jeschke, G.R. & Turk, B.E. (2009) *Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10*. *Biochem J*, 424, 79–88.
- [119] Thompson, A., Schafer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Neumann, T., Johnstone, R., Mohammed, A.K. & Hamon, C. (2003) *Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS*. *Anal Chem*, 75, 1895–904.
- [120] Sorensen, S.B., Sorensen, T.L. & Breddam, K. (1991) *Fragmentation of proteins by S. aureus strain V8 protease. Ammonium bicarbonate strongly inhibits the enzyme but does not improve the selectivity for glutamic acid*. *FEBS Lett*, 294, 195–7.
- [121] Tucher, J., Linke, D., Koudelka, T., Cassidy, L., Tredup, C., Wichert, R., Pietrzik, C., Becker-Pauly, C. & Tholey, A. (2014) *LC-MS based cleavage site profiling of the proteases ADAM10 and ADAM17 using proteome-derived peptide libraries*. *J Proteome Res*, 13, 2205–14.
- [122] Käll, L., Canterbury, J.D., Weston, J., Noble, W.S. & MacCoss, M.J. (2007) *Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets*. *Nat Methods*, 4, 923–5.
- [123] Linke, K.D. (2014) *Method Development for Qualitative, Quantitative and Computational Proteomics*. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel.
- [124] Colaert, N., Helsens, K., Martens, L., Vandekerckhove, J. & Gevaert, K. (2009) *Improved visualization of protein consensus sequences by iceLogo*. *Nat Methods*, 6, 786–7.
- [125] Tan, H.T., Tan, S., Lin, Q., Lim, T.K., Hew, C.L. & Chung, M.C. (2008) *Quantitative and temporal proteome analysis of butyrate-treated colorectal cancer cells*. *Mol Cell Proteomics*, 7, 1174–85.
- [126] Schilling, O., Huesgen, P.F., Barré, O., Auf dem Keller, U. & Overall, C.M. (2011) *Characterization of the prime and non-prime active site specificities of proteases by proteome-derived peptide libraries and tandem mass spectrometry*. *Nat Protoc*, 6, 111–20.
- [127] Stark, G.R., Stein, W.H. & Moore, S. (1960) *Reactions of the Cyanate Present in Aqueous Urea with Amino Acids and Proteins*. *J Biol Chem*, 235, 3177–81.
- [128] Jekel, P.A., Weijer, W.J. & Beintema, J.J. (1983) *Use of endoproteinase Lys-C from Lysobacter enzymogenes in protein sequence analysis*. *Anal Biochem*, 134, 347–54.
- [129] Drapeau, G.R., Boily, Y. & Houmard, J. (1972) *Purification and properties of an extracellular protease of Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 247, 6720–6.
- [130] Schwarz, J., Broder, C., Helmstetter, A., Schmidt, S., Yan, I., Müller, M., Schmidt-Arras, D., Becker-Pauly, C., Koch-Nolte, F., Mittrücker, H.-W., Rabe, B., Rose-John, S. & Chalaris, A. (2013) *Short-term TNF α shedding is independent of cytoplasmic phosphorylation or furin cleavage of ADAM17*. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 3355–67.

- [131] Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C. & Fahrenholz, F. (1999) *Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease*. Proc Natl Acad Sci USA, 96, 3922–7.
- [132] Uemura, K., Kihara, T., Kuzuya, A., Okawa, K., Nishimoto, T., Ninomiya, H., Sugimoto, H., Kinoshita, A. & Shimohama, S. (2006) *Characterization of sequential N-cadherin cleavage by ADAM10 and PS1*. Neurosci Lett, 402, 278–83.
- [133] Hikita, A., Yana, I., Wakeyama, H., Nakamura, M., Kadono, Y., Oshima, Y., Nakamura, K., Seiki, M. & Tanaka, S. (2006) *Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand*. J Biol Chem, 281, 36846–55.
- [134] Aggarwal, B.B., Kohr, W.J., Hass, P.E., Moffat, B., Spencer, S.A., Henzel, W.J., Bringman, T.S., Nedwin, G.E., Goeddel, D.V. & Harkins, R.N. (1985) *Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization*. J Biol Chem, 260, 2345–54.
- [135] Wang, A.M., Creasey, A.A., Ladner, M.B., Lin, L.S., Strickler, J., Van Arsdell, J.N., Yamamoto, R. & Mark, D.F. (1985) *Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor*. Science, 228, 149–54.
- [136] Mullberg, J., Oberthur, W., Lottspeich, F., Mehl, E., Dittrich, E., Graeve, L., Heinrich, P.C. & Rose-John, S. (1994) *The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site*. J Immunol, 152, 4958–68.
- [137] Althoff, K., Reddy, P., Voltz, N., Rose-John, S. & Müllberg, J. (2000) *Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins*. Eur J Biochem, 267, 2624–31.
- [138] Schnölzer, M., Jedrzejewski, P. & Lehmann, W.D. (1996) *Protease-catalyzed incorporation of 18O into peptide fragments and its application for protein sequencing by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Electrophoresis, 17, 945–53.
- [139] Dolnik, O., Volchkova, V., Garten, W., Carbonnelle, C., Becker, S., Kahnt, J., Ströher, U., Klenk, H.-D. & Volchkov, V. (2004) *Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus*. EMBO J, 23, 2175–84.
- [140] Chen, C.-D., Podvin, S., Gillespie, E., Leeman, S.E. & Abraham, C.R. (2007) *Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17*. Proc Natl Acad Sci USA, 104, 19796–801.
- [141] Bloch, L., Sineshchekova, O., Reichenbach, D., Reiss, K., Saftig, P., Kuro-o, M. & Kaether, C. (2009) *Klotho is a substrate for alpha-, beta- and gamma-secretase*. FEBS Lett, 583, 3221–4.
- [142] Chen, C.-D., Tung, T.Y., Liang, J., Zeldich, E., Tucker Zhou, T.B., Turk, B.E. & Abraham, C.R. (2014) *Identification of cleavage sites leading to the shed form of the anti-aging protein klotho*. Biochemistry, 53, 5579–87.

- [143] Vincent, B., Paitel, E., Saftig, P., Frobert, Y., Hartmann, D., De Strooper, B., Grassi, J., Lopez-Perez, E. & Checler, F. (2001) *The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein*. J Biol Chem, 276, 37743–6.
- [144] Liang, J., Wang, W., Sorensen, D., Medina, S., Ilchenko, S., Kiselar, J., Surewicz, W.K., Booth, S.A. & Kong, Q. (2012) *Cellular prion protein regulates its own α -cleavage through ADAM8 in skeletal muscle*. J Biol Chem, 287, 16510–20.
- [145] McDonald, A.J., Dibble, J.P., Evans, E.G.B. & Millhauser, G.L. (2014) *A new paradigm for enzymatic control of α -cleavage and β -cleavage of the prion protein*. J Biol Chem, 289, 803–13.
- [146] Taylor, D.R., Parkin, E.T., Cocklin, S.L., Ault, J.R., Ashcroft, A.E., Turner, A.J. & Hooper, N.M. (2009) *Role of ADAMs in the ectodomain shedding and conformational conversion of the prion protein*. J Biol Chem, 284, 22590–600.
- [147] Nesatyy, V.J., Groh, K., Nestler, H. & Suter, M.J. (2009) *On the acquisition of +1 charge states during high-throughput proteomics: Implications on reproducibility, number and confidence of protein identifications*. J Proteomics, 72, 761–70.
- [148] Biniossek, M.L. & Schilling, O. (2012) *Enhanced identification of peptides lacking basic residues by LC-ESI-MS/MS analysis of singly charged peptides*. Proteomics, 12, 1303–9.
- [149] Zubarev, R.A., Håkansson, P. & Sundqvist, B. (1996) *Accuracy Requirements for Peptide Characterization by Monoisotopic Molecular Mass Measurements*. Anal Chem, 68, 4060–3.
- [150] Rietschel, B., Baeumlisberger, D., Arrey, T.N., Bornemann, S., Rohmer, M., Schuerken, M., Karas, M. & Meyer, B. (2009) *The benefit of combining nLC-MALDI-Orbitrap MS data with nLC-MALDI-TOF/TOF data for proteomic analyses employing elastase*. J Proteome Res, 8, 5317–24.
- [151] Turowec, J.P., Zukowski, S.A., Knight, J.D.R., Smalley, D.M., Graves, L.M., Johnson, G.L., Li, S.S.C., Lajoie, G.A. & Litchfield, D.W. (2014) *An unbiased proteomic screen reveals caspase cleavage is positively and negatively regulated by substrate phosphorylation*. Mol Cell Proteomics, 13, 1184–97.
- [152] Plasman, K., Van Damme, P., Kaiserman, D., Impens, F., Demeyer, K., Helsens, K., Goethals, M., Bird, P.I., Vandekerckhove, J. & Gevaert, K. (2011) *Probing the efficiency of proteolytic events by positional proteomics*. Mol Cell Proteomics, 10, M110.003301.
- [153] Agard, N.J., Mahrus, S., Trinidad, J.C., Lynn, A., Burlingame, A.L. & Wells, J.A. (2012) *Global kinetic analysis of proteolysis via quantitative targeted proteomics*. Proc Natl Acad Sci USA, 109, 1913–8.
- [154] Schlage, P., Egli, F.E., Nanni, P., Wang, L.W., Kizhakkedathu, J.N., Apte, S.S. & auf dem Keller, U. (2014) *Time-resolved analysis of the matrix metalloproteinase 10 substrate degradome*. Mol Cell Proteomics, 13, 580–93.
- [155] Compton, P.D., Zamdborg, L., Thomas, P.M. & Kelleher, N.L. (2011) *On the scalability and requirements of whole protein mass spectrometry*. Anal Chem, 83, 6868–74.

- [156] Callewaert, L. & Michiels, C.W. (2010) *Lysozymes in the animal kingdom*. J Biosci, 35, 127–60.
- [157] Mine, Y., Ma, F. & Lauriau, S. (2004) *Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme*. J Agric Food Chem, 52, 1088–94.
- [158] Ibrahim, H.R., Inazaki, D., Abdou, A., Aoki, T. & Kim, M. (2005) *Processing of lysozyme at distinct loops by pepsin: a novel action for generating multiple antimicrobial peptide motifs in the newborn stomach*. Biochim Biophys Acta, 1726, 102–14.
- [159] Ibrahim, H.R., Imazato, K. & Ono, H. (2011) *Human lysozyme possesses novel antimicrobial peptides within its N-terminal domain that target bacterial respiration*. J Agric Food Chem, 59, 10336–45.
- [160] Benedé, S., López-Expósito, I., Molina, E. & López-Fandiño, R. (2015) *Egg proteins as allergens and the effects of the food matrix and processing*. Food Funct, 6, 694–713.
- [161] Astwood, J.D., Leach, J.N. & Fuchs, R.L. (1996) *Stability of food allergens to digestion in vitro*. Nat Biotechnol, 14, 1269–73.
- [162] Moreno, F.J., Mellon, F.A., Wickham, M.S.J., Bottrill, A.R. & Mills, E.N.C. (2005) *Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion*. FEBS J, 272, 341–52.
- [163] Moreno, F.J., Mackie, A.R. & Mills, E.N.C. (2005) *Phospholipid interactions protect the milk allergen alpha-lactalbumin from proteolysis during in vitro digestion*. J Agric Food Chem, 53, 9810–6.
- [164] Yoshino, K., Sakai, K., Mizuha, Y., Shimizuike, A. & Yamamoto, S. (2004) *Peptic digestibility of raw and heat-coagulated hen's egg white proteins at acidic pH range*. Int J Food Sci Nutr, 55, 635–40.
- [165] Martos, G., Lopez-Expósito, I., Bencharitiwong, R., Berin, M.C. & Nowak-Węgrzyn, A. (2011) *Mechanisms underlying differential food allergy response to heated egg*. J Allergy Clin Immunol, 127, 990–7.e1–2.
- [166] Haider, S.R., Reid, H.J. & Sharp, B.L. (2010) *Modification of tricine-SDS-PAGE for online and offline analysis of phosphoproteins by ICP-MS*. Anal Bioanal Chem, 397, 655–64.
- [167] Haider, S.R., Reid, H.J. & Sharp, B.L. (2012) *Tricine-SDS-PAGE*. Methods Mol Biol, 869, 81–91.
- [168] Schägger, H. & von Jagow, G. (1987) *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Anal Biochem, 166, 368–79.
- [169] Schägger, H. (2006) *Tricine-SDS-PAGE*. Nat Protoc, 1, 16–22.
- [170] Piper, D.W. & Fenton, B.H. (1965) *pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance*. Gut, 6, 506–8.
- [171] Toll, H., Wintringer, R., Schweiger-Hufnagel, U. & Huber, C.G. (2005) *Comparing monolithic and microparticulate capillary columns for the separation and analysis of peptide mixtures by liquid chromatography-mass spectrometry*. J Sep Sci, 28, 1666–74.

- [172] Mohr, J., Swart, R., Samonig, M., Böhm, G. & Huber, C.G. (2010) *High-efficiency nano- and micro-HPLC--high-resolution Orbitrap-MS platform for top-down proteomics*. *Proteomics*, 10, 3598–609.
- [173] Wang, Y., Balgley, B.M., Rudnick, P.A. & Lee, C.S. (2005) *Effects of chromatography conditions on intact protein separations for top-down proteomics*. *J Chromatogr A*, 1073, 35–41.
- [174] Capriotti, A.L., Cavaliere, C., Foglia, P., Samperi, R. & Laganà, A. (2011) *Intact protein separation by chromatographic and/or electrophoretic techniques for top-down proteomics*. *J Chromatogr A*, 1218, 8760–76.
- [175] Jiménez-Saiz, R., Benedé, S., Miralles, B., López-Expósito, I., Molina, E. & López-Fandiño, R. (2014) *Immunological behavior of in vitro digested egg-white lysozyme*. *Mol Nutr Food Res*, 58, 614–24.
- [176] Herriott, R.M. & Northrop, J.H. (1936) *Isolation of crystalline pepsinogen from swine gastric mucosae and its autocatalytic conversion into pepsin*. *Science*, 83, 469–70.
- [177] Lemaire, D., Marie, G., Serani, L. & Laprévotte, O. (2001) *Stabilization of gas-phase noncovalent macromolecular complexes in electrospray mass spectrometry using aqueous triethylammonium bicarbonate buffer*. *Anal Chem*, 73, 1699–706.
- [178] Catalina, M.I., van den Heuvel, R.H.H., van Duijn, E. & Heck, A.J.R. (2005) *Decharging of globular proteins and protein complexes in electrospray*. *Chemistry*, 11, 960–8.
- [179] Hubbard, S.J. (1998) *The structural aspects of limited proteolysis of native proteins*. *Biochim Biophys Acta*, 1382, 191–206.
- [180] Fontana, A., de Laureto, P.P., Spolaore, B. & Frare, E. (2012) *Identifying disordered regions in proteins by limited proteolysis*. *Methods Mol Biol*, 896, 297–318.
- [181] Lioe, H. & O’Hair, R.A.J. (2007) *A novel salt bridge mechanism highlights the need for nonmobile proton conditions to promote disulfide bond cleavage in protonated peptides under low-energy collisional activation*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 18, 1109–23.
- [182] Choi, S., Jeong, J., Na, S., Lee, H.S., Kim, H.-Y., Lee, K.-J. & Paek, E. (2010) *New algorithm for the identification of intact disulfide linkages based on fragmentation characteristics in tandem mass spectra*. *J Proteome Res*, 9, 626–35.
- [183] Liu, F., van Breukelen, B. & Heck, A.J.R. (2014) *Facilitating protein disulfide mapping by a combination of pepsin digestion, electron transfer higher energy dissociation (EThcD), and a dedicated search algorithm SlinkS*. *Mol Cell Proteomics*, 13, 2776–86.
- [184] Schnaible, V., Wefing, S., Resemann, A., Suckau, D., Bücker, A., Wolf-Kümmeth, S. & Hoffmann, D. (2002) *Screening for disulfide bonds in proteins by MALDI in-source decay and LIFT-TOF/TOF-MS*. *Anal Chem*, 74, 4980–8.
- [185] Abonnenc, M., Qiao, L., Liu, B. & Girault, H.H. (2010) *Electrochemical aspects of electrospray and laser desorption/ionization for mass spectrometry*. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 3, 231–54.

- [186] Nicolardi, S., Deelder, A.M., Palmblad, M. & van der Burgt, Y.E.M. (2014) *Structural analysis of an intact monoclonal antibody by online electrochemical reduction of disulfide bonds and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*. Anal Chem, 86, 5376–82.
- [187] Kovacs-Nolan, J., Zhang, J.W., Hayakawa, S. & Mine, Y. (2000) *Immunochemical and structural analysis of pepsin-digested egg white ovomucoid*. J Agric Food Chem, 48, 6261–6.
- [188] Sen, M., Kopper, R., Pons, L., Abraham, E.C., Burks, A.W. & Bannon, G.A. (2002) *Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes*. J Immunol, 169, 882–7.
- [189] Yano, H. (2014) *Ongoing applicative studies of plant thioredoxins*. Mol Plant, 7, 4–13.
- [190] Grosvenor, A.J., Haigh, B.J. & Dyer, J.M. (2014) *Digestion proteomics: tracking lactoferrin truncation and peptide release during simulated gastric digestion*. Food Funct, 5, 2699–705.
- [191] Catherman, A.D., Skinner, O.S. & Kelleher, N.L. (2014) *Top Down proteomics: facts and perspectives*. Biochem Biophys Res Commun, 445, 683–93.
- [192] Wray, W., Boulikas, T., Wray, V.P. & Hancock, R. (1981) *Silver staining of proteins in polyacrylamide gels*. Anal Biochem, 118, 197–203.
- [193] Frese, C.K., Altelaar, A.F.M., van den Toorn, H., Nolting, D., Griep-Raming, J., Heck, A.J.R. & Mohammed, S. (2012) *Toward full peptide sequence coverage by dual fragmentation combining electron-transfer and higher-energy collision dissociation tandem mass spectrometry*. Anal Chem, 84, 9668–73.
- [194] Sterchi, E.E., Stöcker, W. & Bond, J.S. (2008) *Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases*. Mol Aspects Med, 29, 309–28.
- [195] Broder, C. & Becker-Pauly, C. (2013) *The metalloproteinases meprin α and meprin β : unique enzymes in inflammation, neurodegeneration, cancer and fibrosis*. Biochem J, 450, 253–64.
- [196] Prox, J., Arnold, P. & Becker-Pauly, C. (2015) *Meprin α and meprin β : Procollagen proteinases in health and disease*. Matrix Biol, 44-46C, 7-13.
- [197] Beynon, R.J., Shannon, J.D. & Bond, J.S. (1981) *Purification and characterization of a metallo-endoproteinase from mouse kidney*. Biochem J, 199, 591–8.
- [198] Barnes, K., Ingram, J. & Kenny, A.J. (1989) *Proteins of the kidney microvillar membrane. Structural and immunochemical properties of rat endopeptidase-2 and its immunohistochemical localization in tissues of rat and mouse*. Biochem J, 264, 335–46.
- [199] Sterchi, E.E., Green, J.R. & Lentze, M.J. (1982) *Non-pancreatic hydrolysis of N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid (PABA-peptide) in the human small intestine*. Clin Sci, 62, 557–60.
- [200] Sterchi, E.E., Green, J.R. & Lentze, M.J. (1983) *Nonpancreatic hydrolysis of N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid (PABA peptide) in the rat small intestine*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2, 539–47.

- [201] Becker-Pauly, C., Höwel, M., Walker, T., Vlad, A., Aufenvenne, K., Oji, V., Lottaz, D., Sterchi, E.E., Debela, M., Magdolen, V., Traupe, H. & Stöcker, W. (2007) *The alpha and beta subunits of the metalloprotease meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation.* J Invest Dermatol, 127, 1115–25.
- [202] Tang, J. & Bond, J.S. (1998) *Maturation of secreted meprin alpha during biosynthesis: role of the furin site and identification of the COOH-terminal amino acids of the mouse kidney metalloprotease subunit.* Arch Biochem Biophys, 349, 192–200.
- [203] Becker, C., Kruse, M.-N., Slotty, K.A., Köhler, D., Harris, J.R., Rösman, S., Sterchi, E.E. & Stöcker, W. (2003) *Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin.* Biol Chem, 384, 825–31.
- [204] Bertenshaw, G.P., Norcum, M.T. & Bond, J.S. (2003) *Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases. Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers.* J Biol Chem, 278, 2522–32.
- [205] Hahn, D., Pischitzis, A., Roesmann, S., Hansen, M.K., Leuenberger, B., Luginbuehl, U. & Sterchi, E.E. (2003) *Phorbol 12-myristate 13-acetate-induced ectodomain shedding and phosphorylation of the human meprin beta metalloprotease.* J Biol Chem, 278, 42829–39.
- [206] Norman, L.P., Jiang, W., Han, X., Saunders, T.L. & Bond, J.S. (2003) *Targeted disruption of the meprin beta gene in mice leads to underrepresentation of knockout mice and changes in renal gene expression profiles.* Mol Cell Biol, 23, 1221–30.
- [207] Banerjee, S., Jin, G., Bradley, S.G., Matters, G.L., Gailey, R.D., Crisman, J.M. & Bond, J.S. (2011) *Balance of meprin A and B in mice affects the progression of experimental inflammatory bowel disease.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 300, G273–82.
- [208] Broder, C., Arnold, P., Vadon-Le Goff, S., Konerding, M.A., Bahr, K., Müller, S., Overall, C.M., Bond, J.S., Koudelka, T., Tholey, A., Hulmes, D.J.S., Moali, C. & Becker-Pauly, C. (2013) *Metalloproteases meprin α and meprin β are C- and N-procollagen proteinases important for collagen assembly and tensile strength.* Proc Natl Acad Sci USA, 110, 14219–24.
- [209] Jefferson, T., Čaušević, M., auf dem Keller, U., Schilling, O., Isbert, S., Geyer, R., Maier, W., Tschickardt, S., Jumpertz, T., Weggen, S., Bond, J.S., Overall, C.M., Pietrzik, C.U. & Becker-Pauly, C. (2011) *Metalloprotease meprin beta generates nontoxic N-terminal amyloid precursor protein fragments in vivo.* J Biol Chem, 286, 27741–50.
- [210] Bien, J., Jefferson, T., Čaušević, M., Jumpertz, T., Munter, L., Multhaup, G., Weggen, S., Becker-Pauly, C. & Pietrzik, C.U. (2012) *The metalloprotease meprin β generates amino terminal-truncated amyloid β peptide species.* J Biol Chem, 287, 33304–13.
- [211] Herzog, C., Kaushal, G.P. & Haun, R.S. (2005) *Generation of biologically active interleukin-1beta by meprin B.* Cytokine, 31, 394–403.

- [212] Herzog, C., Haun, R.S., Kaushal, V., Mayeux, P.R., Shah, S.V. & Kaushal, G.P. (2009) *Meprin A and meprin alpha generate biologically functional IL-1beta from pro-IL-1beta*. *Biochem Biophys Res Commun*, 379, 904–8.
- [213] Banerjee, S. & Bond, J.S. (2008) *Prointerleukin-18 is activated by meprin beta in vitro and in vivo in intestinal inflammation*. *J Biol Chem*, 283, 31371–7.
- [214] Keiffer, T.R. & Bond, J.S. (2014) *Meprin metalloproteases inactivate interleukin 6*. *J Biol Chem*, 289, 7580–8.
- [215] Tran, J.C. & Doucette, A.A. (2008) *Gel-eluted liquid fraction entrapment electrophoresis: an electrophoretic method for broad molecular weight range proteome separation*. *Anal Chem*, 80, 1568–73.
- [216] Arcone, R., Pucci, P., Zappacosta, F., Fontaine, V., Malorni, A., Marino, G. & Ciliberto, G. (1991) *Single-step purification and structural characterization of human interleukin-6 produced in Escherichia coli from a T7 RNA polymerase expression vector*. *Eur J Biochem*, 198, 541–7.
- [217] Banerjee, S. & Mazumdar, S. (2012) *Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte*. *Int J Anal Chem*, 2012, 282574.
- [218] Zubarev, R.A., Demirev, P.A., Haakansson, P. & Sundqvist, B.U.R. (1995) *Approaches and Limits for Accurate Mass Characterization of Large Biomolecules*. *Anal Chem*, 67, 3793–8.
- [219] Breci, L.A., Tabb, D.L., Yates, J.R. & Wysocki, V.H. (2003) *Cleavage N-terminal to proline: analysis of a database of peptide tandem mass spectra*. *Anal Chem*, 75, 1963–71.
- [220] Tabb, D.L., Smith, L.L., Breci, L.A., Wysocki, V.H., Lin, D. & Yates, J.R. (2003) *Statistical characterization of ion trap tandem mass spectra from doubly charged tryptic peptides*. *Anal Chem*, 75, 1155–63.
- [221] Kapp, E.A., Schütz, F., Reid, G.E., Eddes, J.S., Moritz, R.L., O’Hair, R.A.J., Speed, T.P. & Simpson, R.J. (2003) *Mining a tandem mass spectrometry database to determine the trends and global factors influencing peptide fragmentation*. *Anal Chem*, 75, 6251–64.
- [222] Khatun, J., Ramkissoon, K. & Giddings, M.C. (2007) *Fragmentation characteristics of collision-induced dissociation in MALDI TOF/TOF mass spectrometry*. *Anal Chem*, 79, 3032–40.
- [223] Bertenshaw, G.P., Turk, B.E., Hubbard, S.J., Matters, G.L., Bylander, J.E., Crisman, J.M., Cantley, L.C. & Bond, J.S. (2001) *Marked differences between metalloproteases meprin A and B in substrate and peptide bond specificity*. *J Biol Chem*, 276, 13248–55.

9 Anhang

9.1 Anhang Kapitel 5

Tabelle A1: Identifizierte Spaltstellen (P5 bis P5') des Experimentes „Lys-C Bibliothek + ADAM10“. Anzahl der Spaltstellen, 69; x, nicht eindeutig zuordenbare Aminosäure.

Identifizierte Peptide (LC-MS)	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'
AELGRLGYSVYEDAQYIGHAFK				S	N	A	E	L	G	R
AVIHGLK	A	F	I	A	N	A	V	I	H	G
CNWTPGAATIKPTVEDSK	G	T	V	L	P	C	N	W	T	P
DLLTRDEK	R	R	A	A	R	D	L	L	T	R
FNDSQRQATK	T	V	P	A	Y	F	N	D	S	Q
FSADANTK	I	I	A	D	A	F	S	A	D	A
FVNELPK	P	E	F	L	P	F	V	N	E	L
GLTATGKK	H	R	E	A	R	G	L	T	A	T
GMAFRVPTVDVSVVDLTVK				L	T	G	M	A	F	R
HMLDLSEETDEENISTCVK	P	L	F	S	S	H	M	L	D	L
HTAGRYANK	P	I	F	V	A	H	T	A	G	R
IADLSK				A	T	I	A	D	L	S
IALDTK	x	x	x	x	x	I	A	L	D	T
IATAIEK	x	x	x	x	R	I	A	T	A	I
IAYGLDK	P	T	A	A	A	I	A	Y	G	L
IIDDDVPTILQGAK	G	V	A	Q	R	I	I	D	D	D
ILTGDESSK	A	V	Q	A	A	I	L	T	G	D
IRADPAFKPTEK	S	A	H	E	A	I	R	A	D	P
LAALQIEDPSADELRK	A	L	S	D	A	L	A	A	L	Q
LAAQDVAAK	P	Y	A	A	M	L	A	A	Q	D
LAYGLEK	P	T	A	A	A	L	A	Y	G	L
LHGEESGEEK	G	A	L	M	A	L	H	G	E	G
LIFAGK	P	D	Q	Q	R	L	I	F	A	G
LIGDAAK	T	x	x	E	R	L	I	G	D	A
LIGILENK	E	T	P	S	P	L	I	G	I	L
LILADSEIEISSEK	L	S	Y	A	A	L	I	L	A	D
LISDYADELAELQPVIVNTPHLK	A	L	Q	A	R	L	I	S	D	Y
LLELTQKRMSK	D	L	L	W	L	L	L	E	L	T
LLGENIGMK	Y	E	C	S	F	L	L	G	E	N
LLLQGGNAAPSAADIK	Y	L	A	A	Y	L	L	L	V	Q
LMVGKDEEQVK	A	Q	A	E	A	L	M	V	G	K
LNPYAK	Q	V	L	L	R	L	N	P	Y	A
LPANLVDLNVPK	P	V	Y	L	G	L	P	A	N	L
LPLQDVYK			P	L	R	L	P	L	Q	D
LQEFMIAPTGA	G	G	A	L	A	L	Q	E	F	M
LQQTAFDK	V	H	S	F	R	L	Q	Q	T	A
LTEVRAEDEAALAK	S	A	V	A	A	L	T	E	V	R
LTGIRDYVLNK	C	Q	Y	A	Y	L	T	G	I	R
LTGIRDYVLNKK	C	Q	Y	A	Y	L	T	G	I	R
LTVSEEVK	L	T	P	A	R	L	T	V	S	E
LVDDLRFEPFAGYSK	L	D	P	Q	Y	L	V	D	D	L
LVEQAK	D	A	P	Q	N	L	V	E	Q	A
LVIDRLLPYWQDVIAK	T	E	S	L	A	L	V	I	D	R
MIAPTGA	A	L	Q	E	F	M	I	A	P	T
NIQTAEELDLIVDAIK	G	G	V	A	P	N	I	Q	T	A
NSNLQDILAANAK	F	T	L	S	H	N	S	N	L	Q
QVLEVDDK	G	V	L	S	F	Q	V	L	E	V
RAAEENFNADDK	A	I	A	E	A	R	A	A	E	E
RVVDLIEYVAKA	Y	G	Y	S	A	R	V	V	D	L

<i>Identifizierte Peptide (LC-MS)</i>	<i>P5</i>	<i>P4</i>	<i>P3</i>	<i>P2</i>	<i>P1</i>	<i>P1'</i>	<i>P2'</i>	<i>P3'</i>	<i>P4'</i>	<i>P5'</i>
RVVDLVEHVAKA	Y	G	Y	S	T	R	V	V	D	L
SHLGRPNGERNEK	Y	V	V	L	A	S	H	L	G	R
SLLPTFGAK	G	W	D	H	L	S	L	L	P	T
TGIRDYVLNK	Q	Y	A	Y	L	T	G	I	R	D
THTALVSYK	L	W	S	M	D	T	H	T	A	L
TSNGGAAYFAGK	P	I	I	L	Q	T	S	N	G	G
VFDAPQNLVEQAK	E	I	M	L	P	V	F	D	A	P
VHGEEPTKK	Y	V	S	G	R	V	H	G	E	E
VLLSAPLSK	S	S	x	R	R	V	L	L	S	A
VMGVNEEK	T	A	P	M	F	V	M	G	V	N
VSLAASRAAAAEEK	N	A	I	L	G	V	S	L	A	A
VSMAAARAAAEEK	N	A	I	L	G	V	S	M	A	A
VTLGPDGIEK	F	F	A	S	P	V	T	L	G	P
VVDLIEYVAKA	G	Y	S	A	R	V	V	D	L	I
WGSSNVDIAIDSTGVFK	P	A	N	L	P	W	G	S	S	N
YAALILADSEIEISSEK	E	S	A	L	S	Y	A	A	L	I
YAGEVSHDDK	S	T	H	G	R	Y	A	G	E	V
YISNPLNFGADIVVHSATK	T	F	L	S	P	Y	I	S	N	P
YKLDVDELGDVAQK	P	Q	A	D	F	Y	K	L	D	V
YQVTPEEEDDEE	Y	R	L	A	F	Y	Q	V	T	P

Tabelle A2: Identifizierte Spaltstellen (P5 bis P5') des Experimentes „Glu-C Bibliothek + ADAM10“. Anzahl der Spaltstellen, 149; x, nicht eindeutig zuordenbare Aminosäure.

Identifizierte Peptide (LC-MS)	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'
AAGFLLLE		L	P	Q	R	A	A	G	F	L
AFPSAINQD	P	H	A	L	K	A	F	P	S	A
AIKKKDE	S	S	T	S	Y	A	I	K	K	K
AKAVGKVLPE	S	S	T	G	A	A	K	A	V	G
ATFPIAQPATDVE	V	L	S	A	A	A	T	F	P	I
AVFSAPIRPD	A	L	P	L	P	A	V	F	S	A
AVGKVLPE	T	G	A	A	K	A	V	G	K	V
AVQAAILTGD	V	A	Y	G	A	A	V	Q	A	A
CLSALKNE	A	V	F	A	R	C	L	S	A	L
CNWTPGAATIKPTVE	G	T	V	L	P	C	N	W	T	P
FAGKGISNE	G	G	A	A	Y	F	A	G	K	G
FAGKQLE	Q	Q	R	L	I	F	A	G	K	Q
FDNINNE					F	F	D	N	I	N
FFDFFDNINNE	S	F	N	S	P	F	F	D	F	F
FGNCHGLYAGD	S	I	A	A	A	F	G	N	C	H
FILADAGLE	I	S	F	A	A	F	I	L	A	D
FITTVPCPWLD	N	G	S	Q	F	F	I	T	T	V
FKKTHGAPTDE	P	H	F	N	P	F	K	K	T	H
FKLIDVDGKPKIQVE	M	K	H	F	P	F	K	L	I	D
FKSTLEPVE	L	N	A	A	L	F	K	S	T	L
FKSTLEPVEQVLKD	L	N	A	A	L	F	K	S	T	L
FKTAGIQIVADDLTVNPARIATAIE	A	W	S	H	F	F	K	T	A	G
FNSPFFD				M	S	F	N	S	P	F
FRVPTVDVSVVD	L	T	G	M	A	F	R	V	P	T
FSADANTKTVDKE					A	F	S	A	D	A
FVAIWKHGIVEE		G	T	T	P	F	V	A	I	W
FYDSPQQD	I	W	V	C	P	F	Y	D	S	P
GKITYLKGE				S	K	G	K	I	T	Y
GVLGYTE		G	x	x	K	G	V	L	G	Y
HDGKVKIGLDCASSE	I	K	A	A	G	H	D	G	K	V
HKGVNLPGTDVDLPALSE	G	K	I	C	S	H	K	G	V	N
HMLDLSEE	P	L	F	S	S	H	M	L	D	L
IAISQSDADSE	Y	K	F	Q	Y	I	A	I	S	Q
IAYGLDKKGGKEE	P	T	A	A	A	I	A	Y	G	L
IFAGKQLE		Q	Q	R	L	I	F	A	G	K
IIKGWGE	L	K	P	L	A	I	I	K	G	W
IINVIGEPIDE		T	L	G	R	I	I	N	V	I
IKQAIASNV	A	N	P	A	A	I	K	Q	A	I
IKTGAPARSE	L	R	T	G	Q	I	K	T	G	A
ILADAGLE	S	F	A	A	F	I	L	A	D	A
ILGIIE				L	K	I	L	G	I	I
ILQVFE	V	A	G	A	Q	I	L	Q	V	F
ILSQAPSELE	S	V	Q	S	K	I	L	S	Q	A
ILSQAPTELE	A	P	Q	A	K	I	L	S	Q	A
IMSPVGNPE					Y	I	M	S	P	V
INQDNYPNGGFTAE	A	F	P	S	A	I	N	Q	D	N
IVGIATTFD	A	A	G	C	K	I	V	G	I	A
IVVAKSGEL	A	T	K	A	R	I	V	V	A	K
IWWNGPPGVFE	A	K	A	K	T	I	V	W	N	G
KAFPSAINQD		P	H	A	L	K	A	F	P	S
KAFPSAINQDNYPNGGFTAE		P	H	A	L	K	A	F	P	S
KASGAFTGE	Q	N	A	Y	L	K	A	S	G	A
KIATYQE				G	x	K	I	A	T	Y
KKTHGAPTDE	H	F	N	P	F	K	K	T	H	G
LAADVPLEPE	A	S	T	S	K	L	A	A	D	V
LAKQAFDDAIAE		K	A	C	H	L	A	K	Q	A

Identifizierte Peptide (LC-MS)	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'
LAKVIND	N	C	L	A	P	L	A	K	V	I
LAKVINDAFGIEE	N	C	L	A	P	L	A	K	V	I
LASKLGDKAASE	S	I	R	K	F	L	A	S	K	L
LIASKTFTTAE		T	T	L	F	L	I	A	S	K
LIDHIKVE	S	Y	A	K	Y	L	I	D	H	I
LIDVAVE	P	T	Y	A	K	L	I	D	V	A
LIDVDGKPKIQVE	H	F	P	F	K	L	I	D	V	D
LIFAGKQLE			Q	Q	R	L	I	F	A	G
LIGDAAKNQAALNPRNTVFD					R	L	I	G	D	A
LIGRNFNDPE			A	K	R	L	I	G	R	N
LIADSE		P	L	H	C	L	I	I	A	D
LILADSEIE	L	S	Y	A	A	L	I	L	A	D
LIYVPLPDE					Q	L	I	Y	V	P
LKAFPSAINQD			P	H	A	L	K	A	F	P
LKAFPSAINQDNYPNGGFTAE			P	H	A	L	K	A	F	P
LKASGFTGE	A	Q	N	A	Y	L	K	A	S	G
LKGALAKVPE	L	G	A	V	A	L	K	G	A	L
LKGDAGVSGVVKFE	Q	A	V	A	V	L	K	G	D	A
LLLQGGNAAPSAADIKAVVE	Y	L	A	A	Y	L	L	L	V	Q
LLPWFDGMLE	H	C	A	K	K	L	L	P	W	F
LLQTPIDMSLKPND	N	V	P	A	K	L	L	Q	T	P
LLRIEEE	A	K	L	N	Q	L	L	R	I	E
LLTDYLDRAE			Y	Q	A	L	L	T	D	Y
LNFSGEEIE	T	L	F	A	A	L	N	F	S	G
LNQLLRIEEE		R	L	A	K	L	N	Q	L	L
LPTFGAKDYE		H	L	S	L	L	P	T	F	G
LQVQIPATPTSLE	A	S	P	A	L	L	Q	V	Q	I
LSDPKQLE	I	R	Y	x	x	L	S	D	P	K
LSLQDYLNQQANNQFNKVPE	P	K	T	A	Q	L	S	L	Q	D
LTAATNAKQ	x	x	Q	A	x	L	T	A	A	T
LTGMAFRVPTVDVSVVD		L	Q	G	K	L	T	G	M	A
LTQDKSFND					K	L	T	Q	D	K
LVAPLKPLIE	C	S	T	A	G	L	V	A	P	L
LVDDLPE			P	Q	Y	L	V	D	D	L
LVDDVIYE				A	K	L	V	D	D	V
LVDIKKE	A	K	N	P	V	L	V	D	I	K
LVGGASLKPE				G	F	L	V	G	G	A
LVGGHE	P	x	K	L	P	L	V	G	G	H
LVQGGNAAPSAADIKAVVE	A	A	Y	L	L	L	V	Q	G	G
LVSWDNE	P	K	F	V	K	L	V	S	W	Y
LYQAGGAPE	P	I	M	S	K	L	Y	Q	A	G
MIAPMIE	C	G	P	C	K	M	I	A	P	M
QLTSKLIPE	x	S	T	L	A	Q	L	T	S	K
QRFQPGTSNETPEE	Y	K	A	S	Q	Q	R	F	Q	P
RAGKVKSQTPKVE	H	G	S	L	A	R	A	G	K	V
RKTGVIVGE		Q	I	L	K	R	K	T	G	V
RQAVVNPE	G	I	P	A	K	R	Q	A	V	V
RTGQIKTGAPARSE	L	V	V	G	L	R	T	G	Q	I
RTKYDVAVDE	H	L	V	L	P	R	T	K	Y	D
RVDFKNPHDIE	Q	S	V	G	C	R	V	D	F	K
RVPTVDVSVVD	T	G	M	A	F	R	V	P	T	V
RYGASAGNVGDE	S	L	T	K	K	R	Y	G	A	S
SAADIKAVVE	G	N	A	A	P	S	A	A	D	I
SADANTKTVTDKE				A	F	S	A	D	A	N
SKLGDKAASE	R	K	F	L	A	S	K	L	G	D
SKNLVNDE					Y	S	K	N	L	V
SPSGATKARIVVAKSGEL			S	L	G	S	P	S	G	A
STQLLADIISE	A	S	S	V	Y	S	T	Q	L	L
SVGCRVDFKNPHDIE	L	G	T	A	Q	S	V	G	C	R
SVKDYPRAEE	P	I	L	A	P	S	V	K	D	Y

<i>Identifizierte Peptide (LC-MS)</i>	<i>P5</i>	<i>P4</i>	<i>P3</i>	<i>P2</i>	<i>P1</i>	<i>P1'</i>	<i>P2'</i>	<i>P3'</i>	<i>P4'</i>	<i>P5'</i>
SVYDSRGNPTVE	K	V	Y	A	R	S	V	Y	D	S
TFGAKDYE	L	S	L	L	P	T	F	G	A	K
TGQIKTGAPARSE	V	V	G	L	R	T	G	Q	I	K
TSITRARFEE				F	Y	T	S	I	T	R
TSKLIPE	T	L	A	Q	L	T	S	K	L	I
TTVPCPWLD	S	Q	F	F	I	T	T	V	P	C
VAGKVQPE					K	V	A	G	K	V
VAPLKPLIE	S	T	A	G	L	V	A	P	L	K
VFDAPQNLVE		I	M	L	P	V	F	D	A	P
VFTDVE	W	G	T	I	L	V	F	T	D	V
VMGVNE	T	A	P	M	F	V	M	G	V	N
VQAAILTGDE	A	Y	G	A	A	V	Q	A	A	I
VSWYDNE	K	F	V	K	L	V	S	W	Y	D
VTIISAMGEE				L	M	V	T	I	I	S
VTYIQVE	G	H	Y	A	P	V	T	Y	I	Q
VVDLIE	G	Y	S	A	R	V	V	D	L	I
VVFKLYND	Q	P	I	G	R	V	V	F	K	L
VWAIGTGLAATPE					P	V	W	A	I	G
VYARSVYD	M	A	V	S	K	V	Y	A	R	S
WFDGMLE	K	K	L	L	P	W	F	D	G	M
WGSSNVDIAID	P	A	N	L	P	W	G	S	S	N
WGSSNVDIAIDSTGVFKE	P	A	N	L	P	W	G	S	S	N
WQGLDNGPE	G	I	P	A	G	W	Q	G	L	D
WTKGFDIPNIE	G	I	L	Q	R	W	T	K	G	F
WTKGFDIPNVE	G	I	L	Q	R	W	T	K	G	F
YIQVE	x	x	x	x	x	Y	I	Q	V	E
YISGQINE					P	Y	I	S	G	Q
YLIDHIKVE	A	S	Y	A	K	Y	L	I	D	H
YQAGGAPE	I	M	S	K	L	Y	Q	A	G	G
YQAGGAPGGAAGGAPGGFPGGAPPAPPE	I	M	S	K	L	Y	Q	A	G	G
YTSITRARFEE					F	Y	T	S	I	T
YVGNRADTRE	x	I	x	G	S	Y	V	G	N	R
YVVDTSK	x	I	x	G	R	Y	V	V	D	T

Tabelle A3: Identifizierte Spaltstellen (P5 bis P5') des Experimentes „Lys-C Bibliothek + ADAM17“. Anzahl der Spaltstellen, 197; x, nicht eindeutig zuordenbare Aminosäure.

Identifizierte Peptide (LC-MS)	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'
AAAGAAVANQGKK	L	D	P	E	A	A	A	A	G	A
AAGFLEK	D	L	P	Q	R	A	A	G	F	L
AARPTRPK	N	V	I	H	R	A	A	R	P	T
AELGRLGYSVYEDAQYIGHAFK				S	N	A	E	L	G	R
AFAAEEIDPKK	A	T	L	G	A	A	F	A	A	E
AFGNCHGLYAGDIALRPEILAEHQK	F	S	I	A	A	A	F	G	N	C
AFKPTEK	I	R	A	D	P	A	F	K	P	T
AFRVPTVDVSVVDLTVK		L	T	G	M	A	F	R	V	P
AFRVQVGDIVTVGQCRPISK	V	H	V	S	P	A	F	R	V	Q
AGAAAVANQGKK	P	E	A	A	A	A	G	A	A	A
AGITVYK	A	P	I	L	C	A	G	I	T	V
AIAYGLDK	E	P	T	A	A	A	I	A	Y	G
AIAYGLGAGK	E	P	T	A	A	A	I	A	Y	G
AIRGFLSDLPDFEK	T	M	V	R	R	A	I	R	G	F
AIRPAGQATQK	S	E	I	Q	S	A	I	R	P	A
AQSHNPIENK	D	F	I	L	A	A	Q	S	H	N
ARAAAAEK	V	S	M	A	A	A	R	A	A	A
ARAGELLK	G	Q	Q	E	A	A	R	A	G	E
ARTPANAAPVASTPLK	P	V	A	V	P	A	R	T	P	A
AVAAVFEQK	T	V	A	A	S	A	V	A	A	V
AVFSAPIRPDIVHTVFTSVNK	A	L	P	L	P	A	V	F	S	A
CNWTPGAATIKPTVEDSK	G	T	V	L	P	C	N	W	T	P
FLAILGGAK	N	P	T	R	P	F	L	A	I	L
FRSTLDPVEK	L	C	A	D	L	F	R	S	T	L
FRVPTVDVSVVDLTVK	L	T	G	M	A	F	R	V	P	T
FSADANTK	I	I	A	D	A	F	S	A	D	A
FTFVCPTEIIAFSEAAK	F	I	P	L	A	F	T	F	V	C
IACRFDELLEK	C	H	T	A	H	I	A	C	R	F
IADLSK				A	T	I	A	D	L	S
IALDTK	x	x	x	x	x	I	A	L	D	T
IATAIEK	x	x	x	x	R	I	A	T	A	I
IAYGLDK	P	T	A	A	A	I	A	Y	G	L
IFNLQVPTK	Y	E	T	L	P	I	F	N	L	Q
IGSEVYHNLK	A	E	A	x	R	I	G	S	E	V
IIADAFSADANTK	L	P	V	D	F	I	I	A	D	A
IIEIAK	L	A	M	D	E	I	I	E	I	A
IIGALK		N	N	E	L	I	I	G	A	L
IINEPTAAAIAYGLDK	x	N	V	L	R	I	I	N	E	P
ILCAGITVYK	A	x	V	A	P	I	L	C	A	G
ILTGDESSK	A	V	Q	A	A	I	L	T	G	D
IQLSPK	D	A	x	A	G	I	Q	L	S	P
IRADPAFKPTEK	S	A	H	E	A	I	R	A	D	P
IRAGIIIAK	E	V	A	G	A	I	R	A	G	I
IRRGNVCGDAK					E	I	R	R	G	N
IRTANDVLTIREVLGEQK	V	F	A	S	F	I	R	T	A	N
ISSMVLGK	F	T	P	E	Q	I	S	S	M	V
IYAALPTIK	T	S	N	Q	R	I	V	A	A	L
IVAHVDHGK	x	R	N	x	x	I	V	A	H	V
IVALRK	S	T	I	F	L	I	V	A	L	R
IVGLDK	P	D	E	E	N	I	V	G	L	D
IVSNDELSK	G	Q	S	L	S	I	V	S	N	D
IWADIFAK	V	P	V	E	N	I	W	A	D	I
LAALQIEDPSADELRK	A	L	S	D	A	L	A	A	L	Q
LAAQDVAAK	P	Y	A	A	M	L	A	A	Q	D
LAYGLEK	P	T	A	A	A	L	A	Y	G	L
LCADLFRSTLDPVEK	A	R	F	E	E	L	C	A	D	L

Identifizierte Peptide (LC-MS)	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'
LEARDSK	T	A	V	A	A	L	E	A	A	R
LGGFAITK	L	E	P	R	F	L	G	G	F	A
LHGECSGEEK	G	A	L	M	A	L	H	G	E	G
LIFAGK	P	D	Q	Q	R	L	I	F	A	G
LIGDAAK	T	x	x	E	R	L	I	G	D	A
LIGILENK	E	T	P	S	P	L	I	G	I	L
LILADSEIEISSEK	L	S	Y	A	A	L	I	L	A	D
LINQIVPBLEK	A	P	V	D	A	L	I	N	Q	I
LIQVEIK	E	R	Q	L	Q	L	I	Q	V	E
LISIVNAVNPVAIK	V	A	S	E	T	L	I	S	I	V
LISLDGTANK	A	V	D	D	F	L	I	S	L	D
LISNASDALDK	I	F	L	R	E	L	I	S	N	A
LIVDAIK	E	E	A	L	D	L	I	V	D	A
LLELTQKRMSK	D	L	L	W	L	L	L	E	L	T
LLSDFNTGSFSYSYK	L	S	x	G	A	L	L	S	D	F
LLSSLEGK	A	R	I	N	E	L	L	S	S	L
LMALHGECSGEEK	F	D	V	G	A	L	M	A	L	H
LMVGKDEEQVK	A	Q	A	E	A	L	M	V	G	K
LNAAGNTPDATK	A	A	Y	L	L	L	N	A	A	G
LNAVLEEVK	V	V	E	R	Q	L	N	A	V	L
LNISGEFFRNK	V	R	A	E	x	L	N	I	S	G
LNPYAK	Q	V	L	L	R	L	N	P	Y	A
LPANLVDLNVPK	P	V	Y	L	G	L	P	A	N	L
LPLQDVYK			P	L	R	L	P	L	Q	D
LQQTAFDK	V	H	S	F	R	L	Q	Q	T	A
LQSGIGNIANAVIEGLAGAQFK	E	N	L	L	P	L	Q	S	G	I
LQVQIPATPTSLETAK	A	S	P	A	L	L	Q	V	Q	I
LRGLFIIDPK	x	E	G	x	A	L	R	G	L	F
LRYHIEEESGRK	I	L	L	E	N	L	R	Y	H	I
LSKPEVK	V	Y	V	G	T	L	S	K	P	E
LSRSNGVLNVDNQTSDLVK	V	S	A	L	D	L	S	R	S	N
LSTNETEVAK		H	F	A	A	L	S	T	N	E
LTEVRAEDEAALAK	S	A	V	A	A	L	T	E	V	R
LTGIRDYVLNK	C	Q	Y	A	Y	L	T	G	I	R
LTGIRDYVLNKK	C	Q	Y	A	Y	L	T	G	I	R
LTISPALLDK	A	G	V	D	Y	L	T	I	S	P
LTRRADVK		Q	F	L	E	L	T	R	R	A
LTVSEEVK	L	T	P	A	R	L	T	V	S	E
LVAEAQLSNITREK	A	E	A	E	S	L	V	A	E	A
LVAGIERYPLK	P	F	G	H	A	L	V	A	G	I
LVAIEEEFDIEIPDK	D	T	V	E	L	L	V	A	I	E
LVAPLKPLIEK	C	S	T	A	G	L	V	A	P	L
LVDDLRFEPFAGYSK	L	D	P	Q	Y	L	V	D	D	L
LVDLNVPK	G	L	P	A	N	L	V	D	L	N
LVGGASLKPEFVDIINSRN	D	V	D	G	F	L	V	G	G	A
LVIDNGSGMCK	S	E	V	A	A	L	V	I	D	N
LVIDRLLPYWQDVIAK	T	E	S	L	A	L	V	I	D	R
LVLELNEK	G	E	L	L	R	L	V	L	L	E
LVQGGNAAPSAADIK	A	A	Y	L	L	L	V	Q	G	G
LVSNELEQLSSEALEAARICANK	P	L	C	V	H	L	V	S	N	E
LYAGDIALRPEILAEHQK	G	N	C	H	G	L	Y	A	G	D
MIAPTGAK	A	L	Q	E	F	M	I	A	P	T
NIHVRK	I	F	P	L	Q	N	I	H	V	R
NIQTAAEALDLIVDAIK	G	G	V	A	P	N	I	Q	T	A
QGVGVILCIGETLEEK		F	A	L	G	Q	G	V	G	V
SHLGRPNGERNEK	Y	V	V	L	A	S	H	L	G	R
SHNPIENK	I	L	A	A	Q	S	H	N	P	I
SLKPNDASEK	T	P	I	D	M	S	L	K	P	N
SSGVGVTPLLAMLEEQVK	P	L	V	L	L	S	S	G	V	G
STRVVDLVEHVAKA	N	E	Y	G	Y	S	T	R	V	V

Identifizierte Peptide (LC-MS)	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'
SVSLVK	T	Y	L	D	Y	S	V	S	L	V
TFSFPASQNK	I	P	L	G	F	T	F	S	F	P
TFSYPASQNK	L	P	L	G	F	T	F	S	Y	P
TRAEVSDVGNAILDGCVMLSGETAK	Y	N	P	R	P	T	R	A	E	V
TSAGQPNNLLSASRDK	V	T	S	L	A	T	S	A	G	Q
TSNGGAAYFAGK	P	I	I	L	Q	T	S	N	G	G
TTNCLAPLAK	S	N	A	S	C	T	T	N	C	L
TTQNPDELWEFIADSLK	P	D	A	M	R	T	T	Q	N	P
TTVLAAAK	P	N	A	L	A	T	T	V	L	A
TYQRFVGHK	V	A	T	G	E	T	Y	Q	R	F
VAATLGPK	T	L	A	E	A	V	A	A	T	L
VAAVFEQK	V	A	A	S	A	V	A	A	V	F
VAFTPEERLIGDAAK	V	T	P	S	F	V	A	F	T	P
VAIPVGK	C	P	A	L	G	V	A	I	P	V
VATTGEWDK	Y	E	T	H	R	V	A	T	T	G
VAVPDILDHDNNYELK	G	F	P	R	S	V	A	V	P	V
VFDAPQNLVEQAK	E	I	M	L	P	V	F	D	A	P
VFGLNNIQAEELVEFSSGVK	D	G	I	A	R	V	F	G	L	N
VFGLPGDFNLSLLDK	V	N	x	N	T	V	F	G	L	P
VFSMFGGK	P	P	S	S	A	V	F	S	M	F
VFTGIPGK	F	A	V	A	E	V	F	T	G	I
VFTNEPLTEIK	G	N	V	G	F	V	F	T	N	E
VFTPQDGRGAEGELGAASK	V	E	L	F	E	V	F	T	P	Q
VGAEVDEARINELLSSLEGK	A	V	V	E	S	V	G	A	E	V
VGFDLPQRAAGFLLK	A	H	S	S	M	V	G	F	D	L
VGKDEEQVK	A	E	A	L	M	V	G	K	D	E
VGNPEGPEKPNK	Y	I	M	S	P	V	G	N	P	E
VGNPEGPEKPNKK	Y	I	M	S	P	V	G	N	P	E
VGSLTFDENYNLLDTSQVAK	V	L	P	R	A	V	G	S	L	T
VHGEEDPTKK	Y	V	S	G	R	V	H	G	E	E
VHLVSNELEQLSSEALEAARICANK	E	F	P	L	C	V	H	L	V	S
VIAAAFVK	N	N	V	N	N	V	I	A	A	A
VIAALSEK	G	A	G	A	A	V	I	A	A	L
VIAHVDHGK	V	R	N	M	S	V	I	A	H	V
VIGGPQGDAGLTGRK	P	S	G	R	F	V	I	G	G	P
VIQLLDSLPK	E	I	P	E	H	V	I	Q	L	L
VITFPVPIDADGIIPEK	A	E	A	Q	G	V	I	T	F	P
VLAVAEAK	A	E	V	E	A	V	L	A	G	V
VLGDVIK	V	T	A	A	G	V	L	G	D	V
VLGRAIFTESVK	T	T	S	A	T	V	L	G	R	A
VLVASAK	S	Y	V	E	P	V	L	V	A	S
VMGVNEEK	T	A	P	M	F	V	M	G	V	N
VNTGMPEGK	I	W	V	R	A	V	N	T	G	M
VQAAHIPQGTDLAQVAPILCAGITVYK	A	T	A	D	A	V	Q	A	A	H
VQAAILTGDDESK	A	Y	G	A	A	V	Q	A	A	I
VQGAILTGQSTSDETK	A	Y	G	A	A	V	Q	G	A	I
VQGGEEVNAEELK	E	L	V	A	R	V	Q	G	G	E
VQGGNAAPSAADIK	A	Y	L	L	L	V	Q	G	G	N
VQQAQTEIK	P	I	P	E	E	V	Q	Q	A	Q
VQSLIPKPLESVK	P	T	S	F	P	V	Q	S	L	I
VQVGDIVTVGQCRPISK	S	P	A	F	R	V	Q	V	G	D
VQVRQPIFVAHTAGRYANK	S	L	V	D	Y	V	Q	V	R	Q
VRANGTTVLVGMPAGAK	A	S	T	R	Y	V	R	A	N	G
VRAPEQFDEVVAIAIGNK	L	H	V	D	F	V	R	A	P	E
VRDLSEASVYPEYALPK	V	E	A	A	A	V	R	D	L	S
VRSGEWK	E	F	S	E	Q	V	R	S	G	E
VRVVPNEK	D	W	V	S	Q	V	R	V	V	P
VSGRVHGEEDPTK	D	A	V	E	Y	V	S	G	R	V
VSGRVHGEEDPTKK	D	A	V	E	Y	V	S	G	R	V
VSVSVLVDRLK	P	T	Y	R	Y	V	S	V	S	V

<i>Identifizierte Peptide (LC-MS)</i>	<i>P5</i>	<i>P4</i>	<i>P3</i>	<i>P2</i>	<i>P1</i>	<i>P1'</i>	<i>P2'</i>	<i>P3'</i>	<i>P4'</i>	<i>P5'</i>
VTLGPDGIEK	F	F	A	S	P	V	T	L	G	P
VTRMPEHQK	S	L	T	D	Y	V	T	R	M	P
VVDLIEYVAKA	G	Y	S	A	R	V	V	D	L	I
VVGIYNGK	E	M	I	G	S	V	V	G	I	Y
VVGLRTGQIK	F	I	A	D	L	V	V	G	L	R
VVGLVNTK	N	E	A	F	S	V	V	G	L	V
VVGVNHTK	S	A	P	M	F	V	V	G	V	N
VVGVPSSSQAK	V	G	V	L	H	V	V	G	V	P
VVHLEK	I	H	F	E	P	V	V	H	L	E
VVNPEHLDIVAQK	P	L	I	V	P	V	V	N	P	E
VVQVAVEVK	F	S	V	S	P	V	V	Q	V	A
VVRAPTVK	D	L	L	R	P	V	V	R	A	P
VVSSDFLGDSNSSIFDAAAGIQLSPK	Y	T	E	D	A	V	V	S	S	D
VYDSRGNPTVEVELTTEK	V	Y	A	R	S	V	Y	D	S	R
VYLGLPANLVDLNVPAK	x	T	Q	R	P	V	Y	L	G	L
VYNVYK			P	E	Q	V	Y	N	V	Y
VYQGERVNCK	T	V	Q	F	P	V	Y	Q	G	E
VYSTQLLADIISEASK	E	Q	A	S	S	V	Y	S	T	Q
VYVGTLKPEVK	P	R	Y	G	G	V	Y	V	G	T
WQGLDNGPESRK	G	I	P	A	G	W	Q	G	L	D
WTNIPRK	Y	S	L	L	A	W	T	N	I	P

Tabelle A4: Identifizierte Spaltstellen (P5 bis P5') des Experimentes „Glu-C Bibliothek + ADAM17“. Anzahl der Spaltstellen, 168; x, nicht eindeutig zuordenbare Aminosäure.

Identifizierte Peptide (LC-MS)	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'
AAGFLL		L	P	Q	R	A	A	G	F	L
AFGNCHGLYAGD	F	S	I	A	A	A	F	G	N	C
AFPSAINQD	P	H	A	L	K	A	F	P	S	A
AFRVPTVDVSVVD	K	L	T	G	M	A	F	R	V	P
AIANFLEPQALE	A	P	V	G	A	A	I	A	N	F
AIAYGLDKKGKEE		P	T	A	A	A	I	A	Y	G
AKAVGKVLPE	S	S	T	G	A	A	K	A	V	G
AKGLQTVVVEE	V	L	V	A	S	A	K	G	L	Q
ARSVYDSRGNPTVE	V	S	K	V	Y	A	R	S	V	Y
ARTPANAAPVASTPLKQE	P	V	A	V	P	A	R	T	P	A
ATFPAAQPADTVE	V	L	S	A	A	A	T	F	P	I
AVFSAPIRPD	A	L	P	L	P	A	V	F	S	A
AVGKVLPE	T	G	A	A	K	A	V	G	K	V
AVQAAILTGDE	V	A	Y	G	A	A	V	Q	A	A
FAGKQLE	Q	Q	R	L	I	F	A	G	K	Q
FILADAGLE	I	S	F	A	A	F	I	L	A	D
FKSTLEPVEQVLKD	L	N	A	A	L	F	K	S	T	L
FLASKLGDKAASE	A	S	I	R	K	F	L	A	S	K
FNSPFFD				M	S	F	N	S	P	F
FNSPFFDFFD				M	S	F	N	S	P	F
GVLGYTE		G	x	x	K	G	V	L	G	Y
IACRFDE	C	H	T	A	H	I	A	C	R	F
IAYGLDKKGKEE	P	T	A	A	A	I	A	Y	G	L
IFAGKQLE		Q	Q	R	L	I	F	A	G	K
IGTVPVGRVE	Y	K	I	G	G	I	G	T	V	P
IIKGWGE	L	K	P	L	A	I	I	K	G	W
IKAAGHDGKVKIGLDCASSE					A	I	K	A	A	G
IKQAIANA	A	N	P	A	A	I	K	Q	A	I
IKQAIASNV	A	N	P	A	A	I	K	Q	A	I
IKTGAPARSE	L	R	T	G	Q	I	K	T	G	A
ILADAGLE	S	F	A	A	F	I	L	A	D	A
ILGII				L	K	I	L	G	I	I
ILSQAPTELE	A	P	Q	A	K	I	L	S	Q	A
IMALLDEGE	V	K	A	L	G	I	M	A	L	L
IQIVADDLTVTNPARIATAIE	F	K	T	A	G	I	Q	I	V	A
IQTANIALE	K	L	S	R	A	I	Q	T	A	N
IVKFSPNEQNKHIGE				L	A	I	V	K	F	S
KAFPSAINQD		P	H	A	L	K	A	F	P	S
KAFPSAINQDNYPNGGFTAE		P	H	A	L	K	A	F	P	S
KASGAFTGE	Q	N	A	Y	L	K	A	S	G	A
KGNWGWKPGDE	x	x	G	x	G	K	G	N	W	G
KIATYQE				G	x	K	I	A	T	Y
KLNQLLRIEEE			R	L	A	K	L	N	Q	L
KLPLVGGHE	W	P	L	P	x	K	L	P	L	V
KRGSKSKIE	L	S	S	K	L	K	R	G	S	K
LAKQAFDDAIAE		K	A	C	H	L	A	K	Q	A
LAKVIND	N	C	L	A	P	L	A	K	V	I
LAKVINDAFGIEE	N	C	L	A	P	L	A	K	V	I
LASKLGDKAASE	S	I	R	K	F	L	A	S	K	L
LIFAGKQLE			Q	Q	R	L	I	F	A	G
LIGRNFNDPE			A	K	R	L	I	G	R	N
LIADSE		P	L	H	C	L	I	I	A	D
LISLGLNIDE	S	R	I	N	R	L	I	S	L	G
LKAFPSAINQD			P	H	A	L	K	A	F	P
LKAFPSAINQDNYPNGGFTAE			P	H	A	L	K	A	F	P
LKASGAFTGE	A	Q	N	A	Y	L	K	A	S	G

Identifizierte Peptide (LC-MS)	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'
LKGALAKVPE	L	G	A	V	A	L	K	G	A	L
LKNTISE	S	I	A	Y	S	L	K	N	T	I
LKTKGGNAGTKAYN	S	T	T	S	S	L	K	T	K	G
LLAGIGQITPE	T	T	T	G	L	L	L	A	G	I
LLPWFDMLE	H	C	A	K	K	L	L	P	W	F
LLQTPIDMSLKPND	N	V	P	A	K	L	L	Q	T	P
LNIQLINVQIAID			I	K	K	L	N	I	Q	L
LNQLLRIEEE		R	L	A	K	L	N	Q	L	L
LPLVGGHE	P	L	P	x	K	L	P	L	V	G
LPTFGAKDYE		H	L	S	L	L	P	T	F	G
LQSGIGNIANAVIE		N	L	L	P	L	Q	S	G	I
LQVQIPATPTSLE	A	S	P	A	L	L	Q	V	Q	I
LSKKGSL	A	F	V	K	F	L	S	K	K	G
LSLQDYLNQANNQFNKVPE	P	K	T	A	Q	L	S	L	Q	D
LTAATNAKQ	x	x	Q	A	x	L	T	A	A	T
LTATQKTVD	T	T	V	H	S	L	T	A	T	Q
LTGKTITLE	I	F	V	K	T	L	T	G	K	T
LTKKRYGASAGNVGDE	H	N	L	K	S	L	T	K	K	R
LTNAANVPVE		K	L	L	T	L	T	N	A	A
LTVPKLKPQKD	N	G	V	L	T	L	T	V	P	K
LVAPLKPLIE	C	S	T	A	G	L	V	A	P	L
LVDDLPE			P	Q	Y	L	V	D	D	L
LVDIKKE	A	K	N	P	V	L	V	D	I	K
LVGGASLKPE				G	F	L	V	G	G	A
LVGKNHDE	S	S	V	F	Q	L	V	G	K	N
LVKDAKNPVILAD		T	I	L	A	L	V	K	D	A
LVQGGNAAPSAADIKAVVE	A	A	Y	L	L	L	V	Q	G	G
LVSWDNE	P	K	F	V	K	L	V	S	W	Y
LYQAGGAPE	P	I	M	S	K	L	Y	Q	A	G
LYQAGGAPGGAAGGAPGGFPGGAPPAPPE	P	I	M	S	K	L	Y	Q	A	G
MIAPMIE	C	G	P	C	K	M	I	A	P	M
NIQVWRPADGNE	F	R	S	L	P	N	I	Q	V	W
RVPTVDVSVVD	T	G	M	A	F	R	V	P	T	V
SAGAAAPAGVAGGVAGGEAGEAE	L	L	V	N	F	S	A	G	A	A
SAKSIVPLMD	S	T	L	L	K	S	A	K	S	I
SGATKARIVVAKSGEL	S	L	G	S	P	S	G	A	T	K
SHLGRPNGE	Y	V	V	L	A	S	H	L	G	R
SHLGRPNGERNE	Y	V	V	L	A	S	H	L	G	R
SKLGDKAASE	R	K	F	L	A	S	K	L	G	D
SLGLSPSEAE	A	T	V	M	R	S	L	G	L	S
SRQLKSNDSQE	F	L	A	L	M	S	R	Q	L	K
SSGVGVTPLLAMLE	P	L	V	L	L	S	S	G	V	G
SSNVDAIDSTGVFKE	N	L	P	W	G	S	S	N	V	D
SVGCRVDFKNPHDII	L	G	T	A	Q	S	V	G	C	R
SVKDYRPAEE	P	I	L	A	P	S	V	K	D	Y
SVYDSRGNPTVE	K	V	Y	A	R	S	V	Y	D	S
SYKTKNIVE	G	S	F	S	Y	S	Y	K	T	K
TFGAKDYE	L	S	L	L	P	T	F	G	A	K
TFSYPASQNKINE	L	P	L	G	F	T	F	S	Y	P
TGQIKTGAPARSE	V	V	G	L	R	T	G	Q	I	K
TIKYVLE	V	A	A	L	P	T	I	K	Y	V
TKKRYGASAGNVGDE	N	L	K	S	L	T	K	K	R	Y
TSKLIPE	T	L	A	Q	L	T	S	K	L	I
TVKAYLPVNE	G	T	P	L	F	T	V	K	A	Y
VAAPARAGAVAPE	I	V	S	N	R	V	A	A	P	A
VAAVFE	V	A	A	S	A	V	A	A	V	F
VAGKVQPE					K	V	A	G	K	V
VAPLKPLIE	S	T	A	G	L	V	A	P	L	K
VARNRGIDIVVNE	N	S	V	L	A	V	A	R	N	R
VAVQLKRQPAQPRE	A	K	A	Q	G	V	A	V	Q	L

Identifizierte Peptide (LC-MS)	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'
VFDAPQNLVE		I	M	L	P	V	F	D	A	P
VFGLNNIQAE		G	I	A	R	V	F	G	L	N
VFGLPGDFNLSLLDKIYE	V	N	V	N	T	V	F	G	L	P
VFKLYND	P	I	G	R	V	V	F	K	L	Y
VGCRVDFKNPHDIIE	G	T	A	Q	S	V	G	C	R	V
VGSLTFDE	V	L	P	R	A	V	G	S	L	T
VIGLTN	R	P	A	C	G	V	I	G	L	T
VIGSFKDWE	T	Y	V	K	K	V	I	G	S	F
VINDAFGIEE	A	P	L	A	K	V	I	N	D	A
VINNIPWDITPE	P	P	Y	R	A	V	I	N	N	I
VINVSAQRD	K	L	P	L	S	V	I	N	V	S
VKLPLVGGHE		W	P	L	P	V	K	L	P	L
VKLVSWYDNE	L	S	P	K	F	V	K	L	V	S
VKNQQLEDE	I	K	S	L	T	V	K	N	Q	Q
VKRGGYGKGNWKGPGDE		S	P	N	H	V	K	R	G	G
VKSQTPKVE	A	R	A	G	K	V	K	S	Q	T
VLGKMKE	Q	I	S	S	M	V	L	G	K	M
VLGRAIFTE	T	T	S	A	T	V	L	G	R	A
VLKGDAGVSGVVKFE	V	Q	A	V	A	V	L	K	G	D
VLSALE		K	V	S	S	V	L	S	A	L
VMGVNE	T	A	P	M	F	V	M	G	V	N
VMGVNEE	T	A	P	M	F	V	M	G	V	N
VQAAILTGD	A	Y	G	A	A	V	Q	A	A	I
VQGAILTGGSTSDE	A	Y	G	A	A	V	Q	G	A	I
VQGGNAAPSAADIKAVVE	A	Y	L	L	L	V	Q	G	G	N
VQIPATPTSLE	P	A	L	L	Q	V	Q	I	P	A
VQSLIPKPLE	P	T	S	F	P	V	Q	S	L	I
VSTGGGASLE		K	I	S	H	V	S	T	G	G
VTIISAMGEE				L	M	V	T	I	I	S
VTKHFISE		T	L	Q	A	V	T	K	H	F
VTKYSSSTQA		G	T	R	A	V	T	K	Y	S
VTYIQVE	G	H	Y	A	P	V	T	Y	I	Q
VVFKLYND	Q	P	I	G	R	V	V	F	K	L
VVGASVVVVKNWGAETDE	G	N	A	R	K	V	V	G	A	S
VVRSGLVDAAGVASLLATTE			P	F	K	V	V	R	S	G
VVTFAPAGVTTE	I	K	P	G	M	V	V	T	F	A
VVVGKDTLLTNKHVVD	F	I	A	S	G	V	V	V	G	K
VWAIGTGLAATPE					P	V	W	A	I	G
VYARSVYD	M	A	V	S	K	V	Y	A	R	S
VYARSVYDSRGNPTVE	M	A	V	S	K	V	Y	A	R	S
VYDSRGNPTVE	V	x	A	R	x	V	Y	D	S	R
VYVGTLSKPE	P	R	Y	G	G	V	Y	V	G	T
WAIGTGLAATPE				P	V	W	A	I	G	T
WQGLDNGPE	G	I	P	A	G	W	Q	G	L	D
WTKGFDIPNIE	G	I	L	Q	R	W	T	K	G	F
WTKGFDIPNVE	G	I	L	Q	R	W	T	K	G	F
WTNIPRKE	Y	S	L	L	A	W	T	N	I	P
YAALILADSE		S	A	L	S	Y	A	A	L	I
YARSVYD	A	V	S	K	V	Y	A	R	S	V
YARSVYDSRGNPTVE	A	V	S	K	V	Y	A	R	S	V
YKASQQRFPQGTNETPEE			Q	L	Y	Y	K	A	S	Q
YVGTLSKPE	R	Y	G	G	V	Y	V	G	T	L

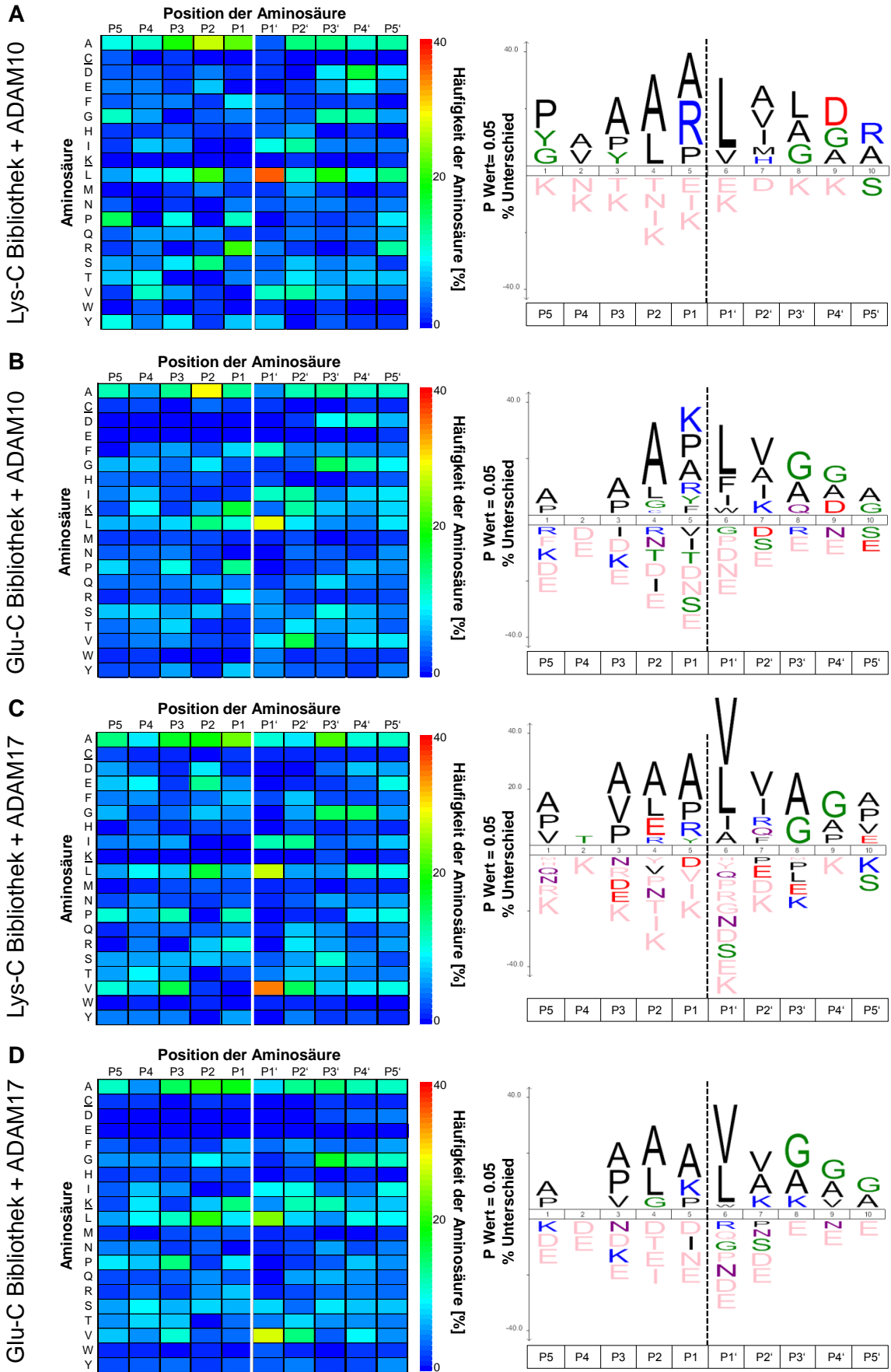


Abb. A1: Legende auf der nächsten Seite.

Abb. A1: Heatmaps und iceLogos für die Inkubation von (A) der Lys-C Bibliothek mit ADAM10 (69 identifizierte Spaltstellen) (B) der Glu-C Bibliothek mit ADAM10 (149 identifizierte Spaltstellen) (C) der Lys-C Bibliothek mit ADAM17 (197 identifizierte Spaltstellen) (D) der Glu-C Bibliothek mit ADAM17 (168 identifizierte Spaltstellen). C = Carbamidomethyliertes Cystein. K = Dimethyliertes Lysin. Die Spaltstelle zwischen P1 und P1' wurde in den Heatmaps mit einer weißen Linie und in den iceLogos mit einer schwarzen gestrichelten Linie gekennzeichnet.

9.2 Anhang Kapitel 6

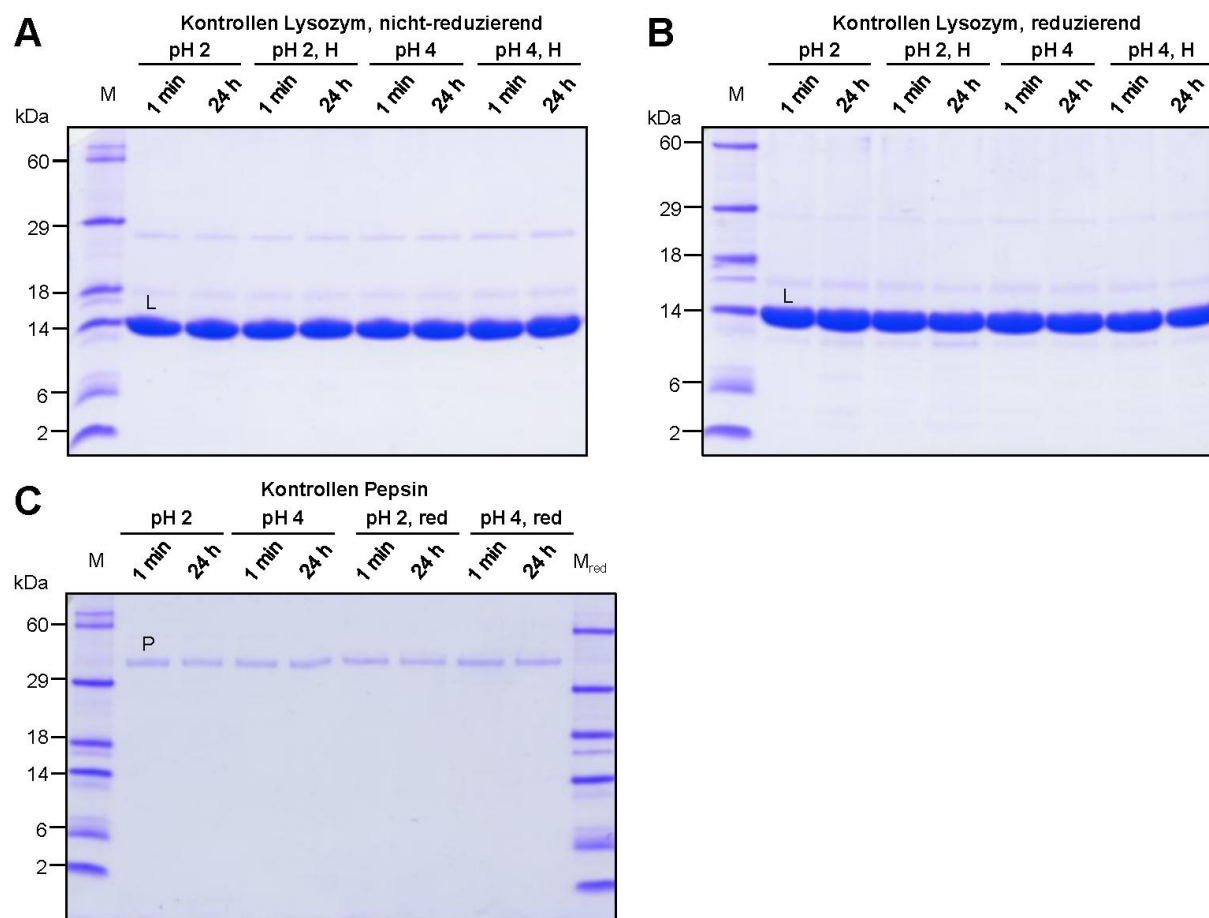


Abb. A2: Tricin-SDS-PAGE Analysen von LYZ- und Pepsin-Kontrollen. Die Kontrollen wurden bei pH 2 bzw. pH 4 inkubiert (Inkubationsdauer jeweils 1 min und 24 h). Tricin-SDS-PAGE Analysen von LYZ-Kontrollen wurden unter nicht-reduzierenden (A) und reduzierenden (B) Bedingungen durchgeführt. Tricin-SDS-PAGE Analyse von Pepsin-Kontrollen (C) wurden unter nicht-reduzierenden (links) und reduzierenden (rechts) Bedingungen durchgeführt. Abkürzungen: H, Erhitzt; L, Lysozym; M, Proteinmassenstandard; P, Pepsin; red, reduziert.

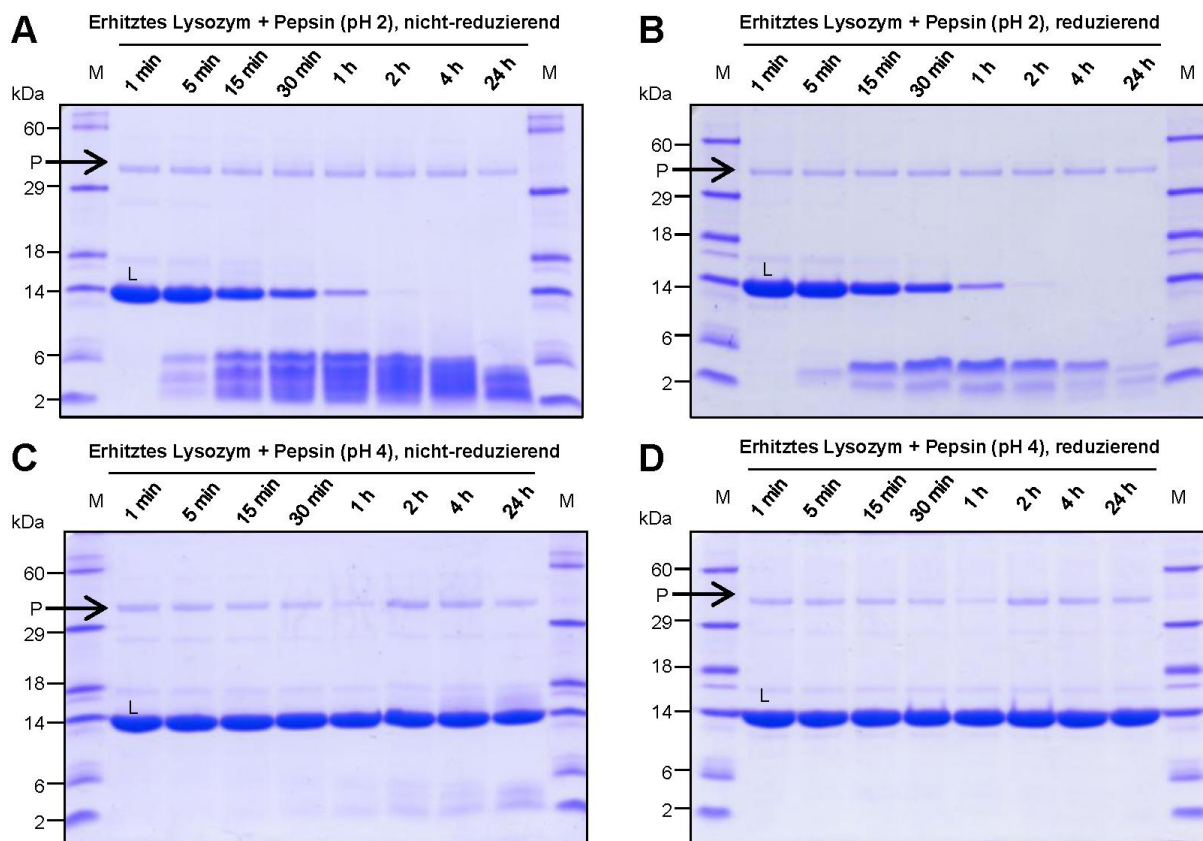


Abb. A3: Tricin-SDS-PAGE Analysen des Pepsin-Verdaus von erhitztem LYZ. Erhitztes LYZ wurde bei pH 2 (A, B) bzw. pH 4 (C, D) mit Pepsin inkubiert (Inkubationsdauer jeweils 1 min, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 24 h). Tricin-SDS-PAGE Analysen wurden unter nicht-reduzierenden (A, C) sowie reduzierenden (B, D) Bedingungen durchgeführt. Abkürzungen: L, Lysozym; M, Proteinmassenstandard; P, Pepsin.

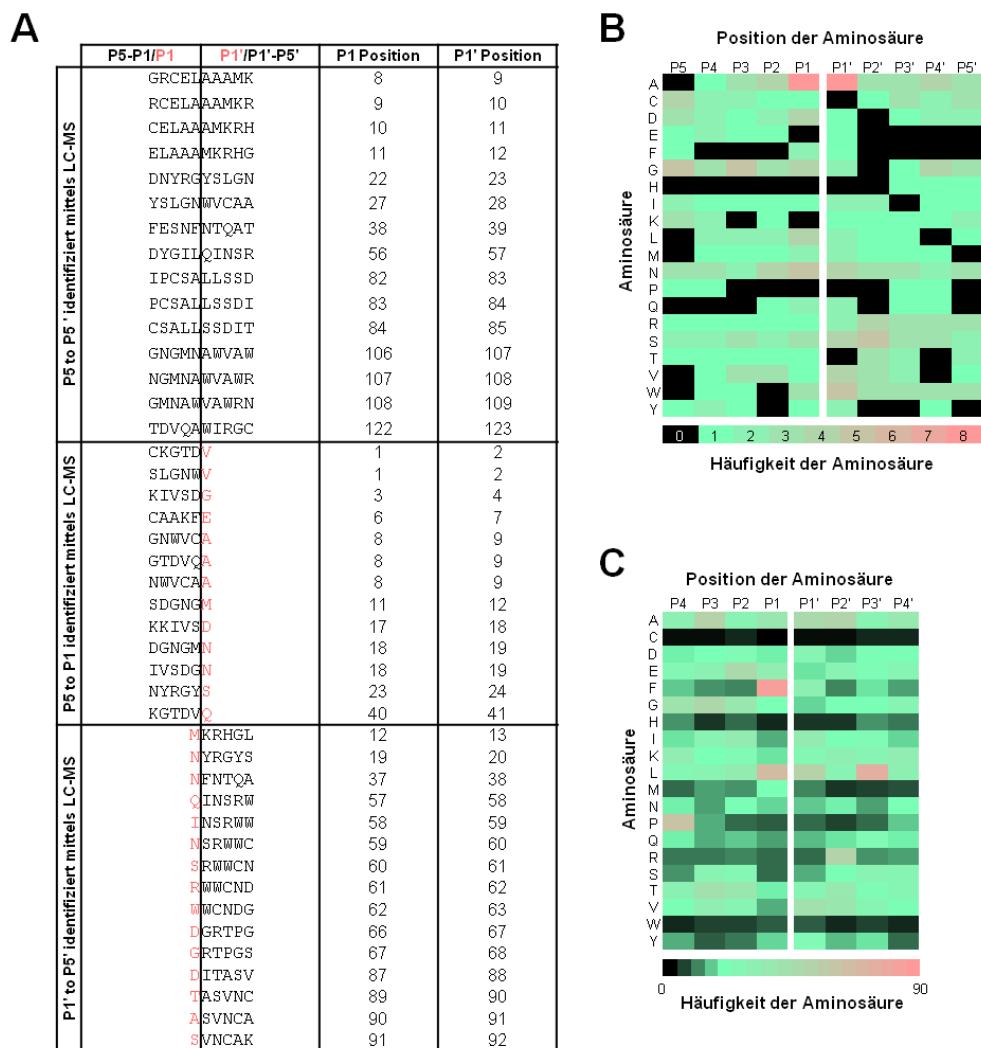


Abb. A4: LYZ-Spaltstellen und Spaltspezifität von Pepsin. (A) Identifizierte Spaltstellen ($n=43$) von Pepsin in LYZ bei pH 2. Für ausschließlich theoretisch annotierte non-prime bzw. prime Sequenzen wurden lediglich P1 bzw. P1' Positionen (rot gekennzeichnet) aufgeführt. (B) Heatmap (P5-P5') zu den in (A) gelisteten Spaltstellen in LYZ. (C) Heatmap (P4-P4') zu den in der MEROPS Datenbank gelisteten Spaltstellen von Pepsin A (*Sus scrofa*) in verschiedenen Substraten (Status: 24.02.2015, $n \leq 415$).

9.3 Anhang Kapitel 7

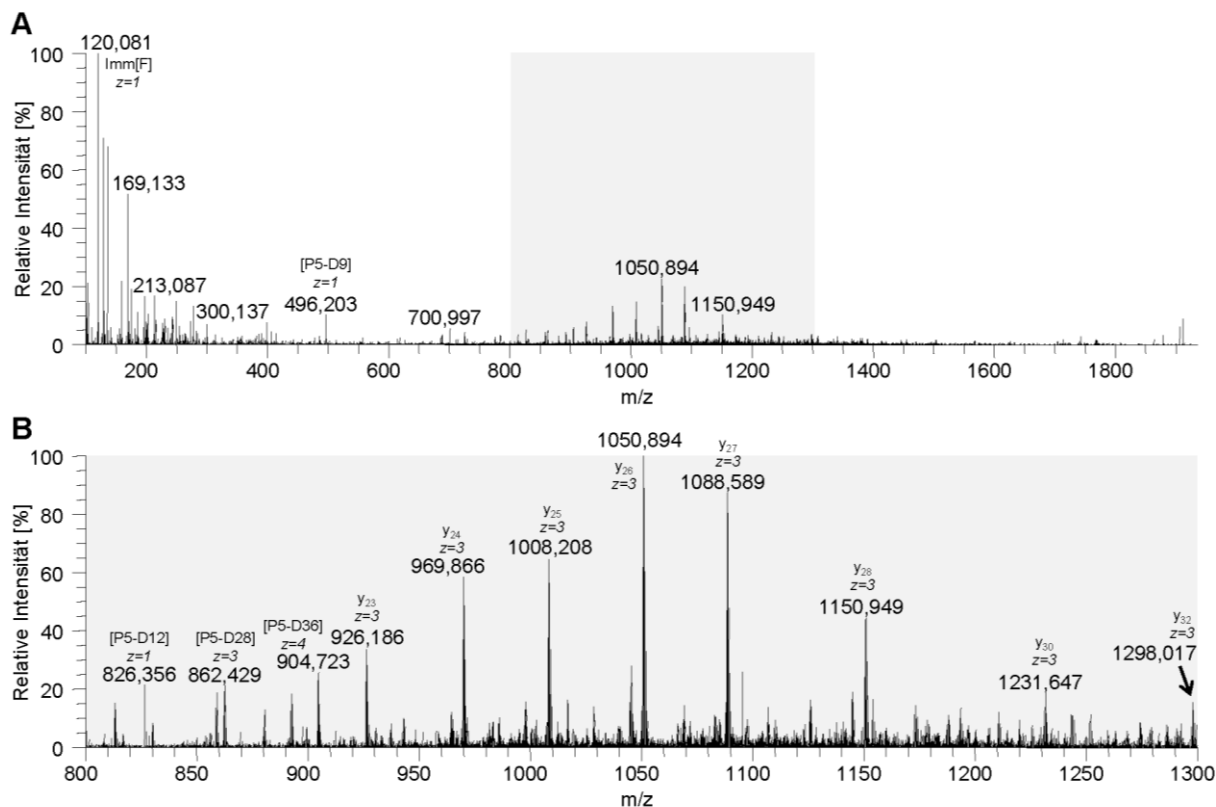


Abb. A5: MS2-Spektrum der online LC-ESI MS Analyse von rh(MAP)IL-6. (B) zeigt einen Ausschnitt von (A). Es ist zu beachten, dass ausschließlich die intensivsten identifizierten Fragmentationen im Spektrum gekennzeichnet wurden. Interne Fragmente wurden in Klammern [X-Y] gesetzt.

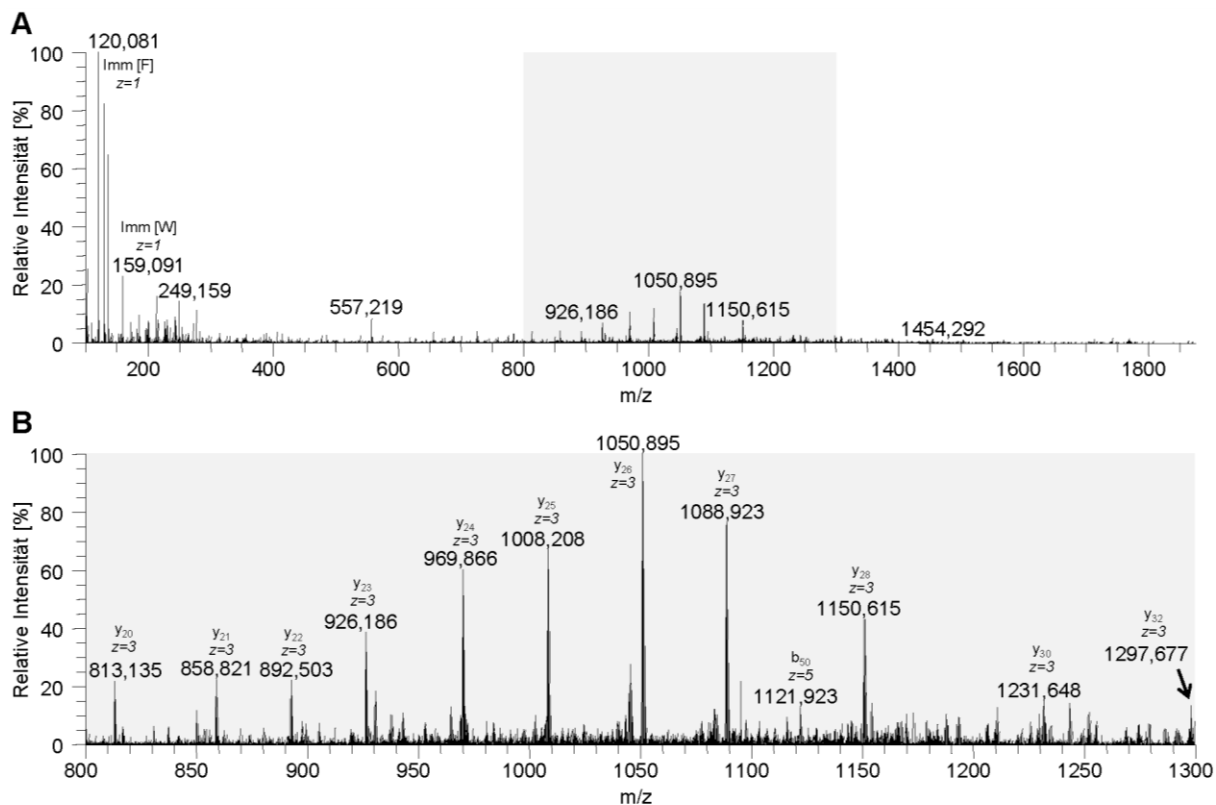


Abb. A6: MS²-Spektrum der online LC-ESI MS Analyse für das durch Meprin- β aus rhIL-6 generierte Spaltprodukt SP2. (B) zeigt einen Ausschnitt von (A). Es ist zu beachten, dass ausschließlich die intensivsten identifizierten Fragmentationen im Spektrum gekennzeichnet wurden.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mithilfe der von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel unter Anleitung meiner akademischen Betreuer verfasst habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet. Die vorliegende Arbeit entstand zwischen April 2012 und Juli 2015 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Tholey am Institut für Experimentelle Medizin unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft und wurde keiner anderen Universität als der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zur Begutachtung vorgelegt.

Joanna Tucher

Kiel, den 10. Juli 2015