

Aus der Abteilung für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin
(Leiter: Univ.-Prof. Dr. Matthias Heckmann)
der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
(geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. Holger Lode)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema: Impact of Storage Conditions on the Breast Milk Peptidome

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2022

vorgelegt von:

Vanessa Maria Rosa Howland

geb. am: 01.10.1990

in: Frankfurt am Main

Dekan: Prof. Dr. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Professor Dr. Matthias Heckmann

2. Gutachter: Professor Dr. Christoph Fusch

(3. Gutachter:)

Ort, Raum: Greifswald, Konferenzraum 0.50/0.51 C_FunGene

Tag der Disputation: 21.04.2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	6
2.1 Probengewinnung.....	6
2.2 Lagerungsexperiment.....	6
2.3 Vorbereitung der Proben	7
2.4 Tandemmassenspektrometrie	9
2.5 Datenanalyse.....	10
3. Ergebnisse	12
3.1 Einfluss der Lagerungsbedingungen auf die Zusammensetzung des Muttermilchpeptidoms.....	12
3.2 Varianz des Muttermilchpeptidoms aufgrund verschiedener Lagerungsbedingungen	13
3.3 Identifikation von Proteasespaltstellen abhängig von den Lagerungsbedingungen	14
4. Diskussion und Fazit	15
Literaturverzeichnis	20
Zusammenfassung	26
Danksagung	27
Eidesstattliche Erklärung	28
Anhang	29

Abkürzungsverzeichnis

AA	engl. "acetic acid", Essigsäure
ACN	Acetonitril
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMBA	engl. „ <i>European Milk Bank Association</i> “ europäische Vereinigung der Frauenmilchbanken
ESI	engl. "electronic spray ionisation", Elektronen spray Ionisation
HKA	Hauptkomponentenanalyse
LC	engl. "Liquid chromatography", Flüssigkeitschromatographie
LTQ	engl. "Linear Trap Quadrupole", Lineare Quadrupol-Ionenfalle
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NEC	nekrotisierende Enterokolitis
RT	Raumtemperatur
SSW	Schwangerschaftswoche
UPLC	engl. "ultra performance liquid chromatography", Hochleistungsflüssigkeitschromatografie

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lagerungsbedingungen	7
Abbildung 2: Hauptkomponentenanalyse	14

1. Einleitung

Muttermilch ist die beste und empfohlene Nahrung für Säuglinge in den ersten sechs Monaten. Auch nach Einführung der Beikost wird das Stillen mindestens bis zum Ende des ersten Lebensjahres sowohl von der Weltgesundheitsorganisation als auch von der Europäischen Gesellschaft für Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung empfohlen. Neuere Forschung zeigt, dass Muttermilch viel mehr als ein Nahrungsmittel ist (vgl. Christian et al. 2021). Muttermilch verändert sich in ihrer Zusammensetzung in Abhängigkeit von der mütterlichen und kindlichen Gesundheit, stärkt die soziale Bindung zwischen Mutter und Kind und hat das Potenzial, als Biomarker für Brustkrebs (vgl. Aslebagh et al. 2019) sowie als Therapeutikum für Neugeborene und Säuglinge eingesetzt zu werden (vgl. Bode et al. 2020).

Ein besseres Verständnis der Funktion und der Zusammensetzung von Muttermilch könnte einen wichtigen Beitrag zur Prävention von Krankheiten sowohl bei Müttern als auch bei Kindern leisten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Mütter, die gestillt haben, ein geringeres Risiko für Brustkrebs, Ovarialkarzinom, postnatale Depressionen und kardiometabolische Erkrankungen wie Typ-2-Diabetes und Bluthochdruck aufweisen (vgl. Victora et al. 2016; vgl. Binns et al. 2016).

Säuglinge, die gestillt wurden, leiden in ihrem späteren Leben weniger unter Adipositas. Bis in das Jugendalter konnte eine Senkung der Adipositasrate um 15 bis 30 % gezeigt werden. Das Risiko, an Typ-1-Diabetes zu erkranken, sinkt um bis zu 30 %. Die Inzidenz von Asthma und Neurodermitis ist bei gestillten Säuglingen um bis zu 27 % reduziert. Auch auf Autoimmunerkrankungen wie Zöliakie oder chronisch entzündliche Darmerkrankungen hat das Stillen einen positiven Einfluss. Es konnte gezeigt werden, dass Kinder, die zum Zeitpunkt der ersten glutenhaltigen Kost noch gestillt werden, ein um 52 % geringeres Risiko aufweisen, an Zöliakie zu erkranken. Das Auftreten chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist um 31 %

reduziert. Zusätzlich hat Stillen einen präventiven Effekt auf die Inzidenz von Infektionskrankheiten vom Neugeborenen- bis zum Grundschulalter (vgl. Eidelman et al. 2012).

Vulnerable Gruppen wie Frühgeborene profitieren ebenfalls von der Ernährung mit Muttermilch oder, falls Stillen nicht möglich ist, mit Spenderfrauenmilch. So zeigen Frühgeborene, die Frauenmilch erhalten haben, ein signifikant geringeres Risiko, an einer Sepsis oder einer nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) zu erkranken, was die häufigste entzündliche Erkrankung des Magendarmtraktes bei Frühgeborenen mit einem Gewicht unter 1500 g ist (vgl. Quigley et al. 2019). Insgesamt belegen mehrere Studien, dass Stillen von der Geburt an die Mortalität von Neugeborenen senkt (vgl. Edmond et al. 2006).

Deswegen wird auch empfohlen, Frühgeborene und Neugeborene, die von ihren Müttern nicht gestillt werden können, mit gespendeter Frauenmilch zu ernähren. Aktuell gibt es in Deutschland an 33 Standorten Frauenmilchbanken, unter anderem in Greifswald (vgl. Arslanoglu et al. 2013; vgl. Frauenmilchbank-Initiative o.D.).

Während die biochemischen Mechanismen hinter manchen dieser Effekte bereits gut erforscht sind, zum Beispiel der Zusammenhang der Infektionsprävention bei Neugeborenen und den in der Muttermilch enthaltenen Immunzellen und Antikörper, sind die hinter anderen Effekten des Stillens, zum Beispiel der Prävention von Typ-I-Diabetes und Adipositas sowie der Prävention einer NEC bei Frühgeborenen, noch weitgehend ungeklärt (vgl. Bode et al. 2020). Besonders die Vielzahl an bioaktiven Stoffen, die in Frauenmilch enthalten sind, scheint in diesem Zusammenhang eine Rolle zu spielen. Neben Immunzellen wie Makrophagen oder Stammzellen zählen zu diesen Stoffen Immunglobuline (vor allem IgA), Zytokine, Hormone, Wachstumsfaktoren, Lysozyme und antimikrobielle Peptide. Bei einem Großteil dieser Substanzen handelt es sich um Proteine.

Proteine, die in Frauenmilch enthalten sind, werden in drei Untergruppen unterteilt: Kaseine, Molkenproteine und Mucine, die in der

milk fat globule membrane (MFGM) enthalten sind (vgl. Donovan 2019). Auch die beim Abbau dieser Milchproteine freigesetzten Peptidfragmente haben eine Reihe von einzigartigen biologischen Wirkungen, die sich von denen der Ausgangsproteine unterscheiden. Insgesamt wurden bereits über 1100 Peptide aus 42 Proteinen bestimmt. Aufgrund von Vergleichen ihrer Peptidsequenzen und derer bekannten Funktionen kann davon ausgegangen werden, dass über 300 Peptide eine bioaktive Wirkung haben (vgl. Ballard/ Morrow 2013). Die meisten identifizierten Peptide stammen von dem Protein Beta-Casein, aber auch von Molkeproteinen wie α -Lactalbumin, Lactoferrin oder Immunoglobulinen (vgl. Wada/ Lönnerdal 2020). Obwohl auf dieser Grundlage eine wesentlich größere Diversität des humanen Milchpeptidoms als des Proteoms angenommen werden kann, gibt es bisher deutlich weniger Studien zum Milchpeptidom (vgl. Zhu/ Dingess 2019).

Am häufigsten wurde in der aktuellen Literatur die antimikrobielle Wirkung der Milchpeptide beschrieben. Es wurde gezeigt, dass eine Mischung von Milchpeptiden das Wachstum von Bakterien wie *Escheria coli* und *Staphylococcus aureus* Gruppe B hemmt. Solche antimikrobiellen Peptide im Gastrointestinaltrakt des Säuglings könnten auch bei der Prävention der NEC bei Frühgeborenen durch Muttermilch eine Rolle spielen (vgl. Dallas et al. 2013). Zudem ist belegt, dass sich die Peptidzusammensetzung in Muttermilch von Müttern, die vor der 37. Schwangerschaftswoche (SSW) entbunden haben, von der Peptidzusammensetzung der Muttermilch von Müttern mit reifgeborenen Säuglingen (> 37. SSW) unterscheidet. Muttermilch von Müttern von Frühgeborenen enthält eine wesentlich höhere Anzahl an Proteinen und endogenen Peptiden. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Muttermilch optimal an das noch unreife Verdauungssystem angepasst ist (vgl. Dallas et al. 2015).

In der Muttermilch wurden Peptide mit antihypertensiver Funktion identifiziert. Diese könnten im Zusammenhang mit der präventiven Wirkung der Muttermilch hinsichtlich kardiometabolischer Erkrankungen stehen. Weitere bioaktive Peptide fungieren als Opioid-Rezeptor-

Agonisten, weisen eine antioxidative Wirkung auf oder unterstützen die Zellproliferation (vgl. Nielsen et al. 2017; vgl. Ferranti et al. 2004).

Obwohl das humane Milchpeptidom ein enormes Potenzial bietet, fehlt es an Grundlagenwissen. Während sich die Möglichkeiten zur Analyse mittels Massenspektrometrie (MS) rasant weiterentwickeln, gibt es keine einheitlichen Protokolle zu dem Einfluss der Abnahmebedingungen und Lagerungstemperaturen auf die Stabilität des Muttermilchpeptidoms. Dies schränkt die Vergleichbarkeit von Studien ein.

Bezogen auf die Proteine und die endogenen Peptide ist vor allem die posttranslationale Modifikation – die Veränderung der Proteine und Peptide nach ihrer Synthese – von Bedeutung. Die Generierung von Peptiden aus Proteinen erfolgt physiologisch sowohl in den Brustdrüsen als auch im Gastrointestinaltrakt der Säuglinge. Frauenmilch enthält ein umfangreiches proteolytisches System bestehend aus Enzymen, Zymogenen, Proteaseaktivatoren und Proteaseinhibitoren (vgl. Chan et al. 2021). Diese Bestandteile sind bei unterschiedlichen Temperaturen aktiv, weshalb anzunehmen ist, dass die Spaltung der Proteine und Peptide auch nach dem Abpumpen der Muttermilch voranschreitet. Ob bioaktive Peptide, die in Frauenmilch enthalten sind, ihre Wirksamkeit entfalten können, hängt auch davon ab, ob sie ihren Wirkort erreichen oder vorher bereits abgebaut werden. Es ist anzunehmen, dass direktes Einfrieren bei -80 °C oder Gefrier-trocknen (vgl. Hahn et al. 2018) die geringsten Veränderungen des Muttermilchpeptidoms herbeiführt. Dieses Vorgehen ist jedoch sowohl im klinischen als auch im wissenschaftlichen oder privaten Umfeld nur schwer umzusetzen.

Im aktuellen Statement der Europäischen Vereinigung der Frauenmilchbanken (*European Milk Bank Association, EMBA*) aus dem Jahr 2019 wird empfohlen die Spendermilch so schnell wie möglich, spätestens aber nach einer Lagerung von 24 Stunden bei Raumtemperatur einzufrieren. Diese und andere internationale Empfehlungen zur Lagerung von Frauenmilch ergeben sich aus Studien, in denen vor

allem der Einfluss der Temperatur und der Lagerungsdauer auf bakterielle Kontamination, immunologische Komponenten, Nährstoffqualität sowie Metaboliten und deren Stabilität betrachtet wurde (vgl. Eglash et al. 2017). In Deutschland gibt es aktuell keine Leitlinie zur Lagerung von Frauenmilch, die Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin e.V. (GNPI) arbeitet jedoch aktuell an einer Leitlinie zum Einsatz und zur Behandlung eigener und gespendeter Muttermilch in der Neonatologie, die Veröffentlichung ist für Januar 2023 geplant (vgl. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. o.D.). Wie sich die Temperatur und die Dauer der Lagerung auf die bioaktiven Peptide in der Muttermilch und ihre Funktion auswirkt, ist bisher nicht untersucht worden. Diese Untersuchungen sind aus wissenschaftlichen Gründen (vergleichbare und reproduzierbare Studienbedingungen) und klinischen Gründen (Stabilität des Peptidoms von Spenderfrauenmilch, sowie zur Aktualisierung der Empfehlungen) notwendig (vgl. van der Voorn et al. 2016).

Ziel der Studie war es, den Einfluss verschiedener temperaturabhängiger Lagerungsbedingungen auf die Stabilität des Muttermilchpeptidoms zu untersuchen. Hierfür wurden Lagerungsbedingungen ausgewählt, die in alltäglichen Situationen, zum Beispiel beim Sammeln von Frauenmilch im häuslichen Umfeld der Frauen beim Transport in die Klinik oder beim Sammeln in spezialisierten Zentren, vorkommen könnten (Lagerung bei Raumtemperatur (RT), bei 4 °C und bei -20 °C). Diese wurden mit dem Muttermilchpeptidom in den Proben, die innerhalb von einer Stunde nach dem Abpumpen bei -80 °C gelagert wurden verglichen. Zur Bestimmung der Stabilität des Peptidomusters wurden mittels Tandemmassenspektrometrie das Muttermilchpeptidom, die N- und C-terminalen Aminosäuren der Peptide und die Proteine, von denen die Peptide stammen, untersucht.

2. Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden die in der Publikation genannten Methoden zusammengefasst (vgl. Howland et al. 2020) und um das detaillierte Vorgehen bei der Vorbereitung der Proben ergänzt.

2.1 Probengewinnung

Im Rahmen der Studie wurden die Muttermilchproben von vier Spenderinnen untersucht. Die Spenderinnen und ihre reifgeborenen Kinder, die zum Zeitpunkt der Probengewinnung mindestens sechs Wochen alt waren, waren gesund. Die Muttermilchproben wurden zwischen 8:00 und 10:00 Uhr gesammelt. Die ersten Tropfen Muttermilch wurden mit der Hand ausgestrichen und dann verworfen. Im Anschluss wurde der Brustwarzenvorhof mit einem sauberen Waschlappen und Wasser gesäubert. Mittels einer elektrischen Muttermilchpumpe (Medela Medizintechnik, Dietersheim, Deutschland) wurden 20 ml Muttermilch gewonnen. Die Muttermilchproben wurden im Institut für funktionelle Genomforschung innerhalb einer Stunde in 2000- μ l-Aliquots aufgeteilt. Die Lagerung erfolgte dann unter vier verschiedenen Temperaturbedingungen. Nach der Lagerung bei Raumtemperatur, bei 4 °C oder bei –20 °C wurden alle Proben bei –80 °C bis zur Analyse eingefroren.

2.2 Lagerungsexperiment

Die Szenarien im Lagerungsexperiment dienen dem Verständnis des Einflusses von Temperatur und Dauer der Lagerung auf das Muttermilchpeptidom. Hierfür wurden das Muttermilchpeptidom in den folgenden vier Szenarien, die sowohl in klinischen Studien als auch in der Häuslichkeit denkbar sind, mit dem Muttermilchpeptidom in den Proben die nach einer Stunde bei –80 °C gelagert wurden verglichen: Lagerung bei –20 °C für 120 h, Lagerung bei 4 °C für 6 h, Lagerung bei Raumtemperatur für 6 h und Lagerung bei Raumtemperatur für 24 h (siehe Abbildung 1).

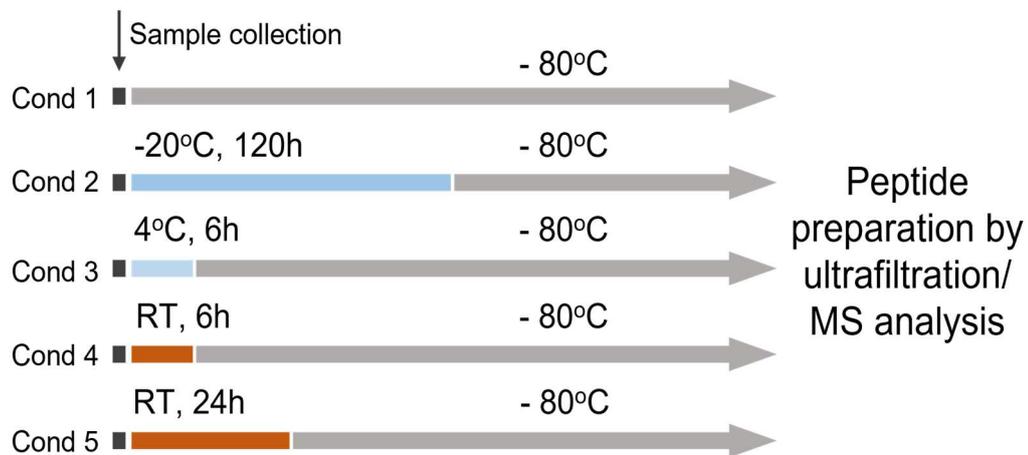


Abbildung 1: **Lagerungsbedingungen**

Verschiedene Lagerungsbedingungen für den Vergleich der Stabilität des Muttermilchpeptidoms (Howland et al. 2020)

2.3 Vorbereitung der Proben

Die Peptidisolierung erfolgte mittels filterunterstützter Methanol-Extraktion für jede Probe in vier technischen Replikaten. Dazu wurden die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur und danach für 20 Minuten im Eisbad aufgetaut. Anschließend wurden sie mit 17 000 g für 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Hierdurch wurde die Muttermilch in einen klaren, zell- und fettfreien Überstand, der lediglich Proteine enthält, sowie einen Zellteile und Fett enthaltenden Rückstand getrennt. Die obere Lipidschicht wurde verworfen. Vom klaren Überstand wurden 100 µl gesammelt, mit 25 µl Methanol gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Proteinpeptidaggregate aufzulösen. Zur Trennung von Proteinen und Peptiden wurden die Proben über eine Ultrafiltrationsmembran mit einer Ausschlussgröße von 10 kDA (Vivacon 500, Sartorius, Göttingen, Germany) 10 Minuten bei 14 000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Filtrat bei 0 °C und 1030 mbar gefriertrocknet, um das Lösungsmittel zu entziehen (Alpha1-4 LSC, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland). Die Proben wurden

zunächst in 10 µl 1%-Essigsäure (AA) resuspendiert, womit auch ein pH-Wert von 2 bis 3 eingestellt wurde.

Danach wurden Salze und ähnliche niedermolekulare Substanzen aus der Peptidfraktion unter Verwendung von C18-RP-Material abgetrennt (µZipTip, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland). Die Entsalzung erfolgte nach folgendem Protokoll; die Zusammensetzung der zur Äquilibration und Entsalzung genutzten Lösungen ist Tabelle 1 im Anhang 1 zu entnehmen:

1. Vorbereitung von drei Reaktionsgefäßen: Reaktionsgefäß 1 mit 50 µl Lösung 6, Reaktionsgefäß 2 mit 10 µl Lösung 3, Reaktionsgefäß 3 mit 10 µl Lösung 4
2. Aktivierung der Festphase (µZipTip) mit 100%igem Acetonitril (ACN), zweimalige Wiederholung des Vorgangs
3. Äquilibration durch schrittweises Absenken der ACN-Konzentration, wozu ein fünffaches Aufziehen und Verwerfen der Lösungen 3 bis 5 und ein zweimaliges Aufziehen und Verwerfen von Lösung 6 erfolgte
4. Aufbringen der Probe auf die C18-ZipTip-Spitze mittels zehnmaligen Aufziehens
5. Waschung mit 50 µl 1%ige Essigsäure (fünf Schritte je 10 µl)
6. Elution der Peptide durch zunächst zehnfaches Auf- und Abpipettieren mit 10 µl Lösung 4 und im Anschluss zehnfaches Auf- und Abpipettieren mit 10 µl Lösung 3
7. Vereinigung der Eluate in einem MS-geeigneten Mikroinsert für Autosampler-Flaschen
8. Einfrieren bei -80 °C und Entfernen der Lösungsmittel mittels Lyophilisation

2.4 Tandemmassenspektrometrie

Das Peptidom wurde mittels Massenspektrometrie (MS) nach Vortrennung der Peptide durch Flüssigchromatographie (LC) bestimmt. Für die Analyse wurde eine nanoAcquityUPLC (Waters Corporation, Washburn, MA, USA) mit einem Lineare Quadrupol-Ionenfalle (LTQ)-Orbitrap-Velos-Massenspektrometer (Thermo Electron, Bremen, Deutschland) gekoppelt. Die Ionisierung erfolgte über eine Elektrospray-Ionisations-Quelle (ESI).

Zur Konzentration der Peptide und zum nochmaligen Abtrennen verbliebener niedermolekularer Substanzen wurden die Peptide zunächst auf eine C18-Vorsäule geladen (nanoAcquity UPLC 2G-V/M, 20 mm Länge, 180 µm Innendurchmesser (i. d.), 5 µm Partikelgröße, Waters Corporation). Die anschließende chromatographische Trennung erfolgte auf einer analytischen High-Pressure-Liquid-Chromatographie(HPCL)-Säule (nanoAcquity BEH130 C18-Säule, 10 cm Länge, 100 µm i. d., 1,7 µm Partikelgröße, Waters Corporation) bei einer Flussrate von 400 nL/min mit einer Laufzeit von 92 Minuten über einen nichtlinearen Gradienten mit Eluent A (Wasser mit 0,1 % AA und 0,5 % Dimethylsulfoxid [DMSO]) und Eluent B (ACN mit 0,1 % AA und 5 % DMSO) (siehe Tabelle 2, Anhang 1). Die Peptide wurden im Data-Dependent-Modus erfasst. Für diesen Modus sind mehrere Schritte erforderlich, für die das Massenspektrometer automatisch zwischen dem LTQ-Orbitrap-MS (Thermo Electron Corp., Bremen, Deutschland) und dem LTQ-MS/MS wechselt. In der LTQ-Orbitrap wurden Ionen mit einem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) von 325 bis 1525 bei einem Auflösungsvermögen von $R = 30\,000$ mit einer Target-Ionenzahl von 1×10^6 erfasst. Die Spannung für die Ionisation betrug 1,5 bis 1,7 kV bei einer Kapillartemperatur von 300 °C. Die Molekülmassen der eluierten Peptide wurden in der Orbitrap im ‚positiv‘- und im ‚profile‘-Modus analysiert.

Die zwanzig intensivsten doppelt und dreifach geladenen Ionen wurden mittels kollisionsinduzierter Dissoziation (CID) mit einem Isolationsfenster von 2Da und einer Target-Ionenzahl von 1×10^4 bei einer

maximalen Sammelzeit von 100 ms (MS/MS) fragmentiert. Bereits erfasste Ionen wurden anschließend für 60 Sekunden von der Fragmentierung ausgeschlossen.

2.5 Datenanalyse

Für die qualitative und quantitative Analyse der Massenspektrometriedaten wurde das Programm ‚Proteom Discoverer 2.2‘ (Thermo Scientific, Bremen, Deutschland) verwendet. Zur Identifikation der Peptide wurde die Software SEQUEST HT eingesetzt.

Die Identifizierung der Peptide erfolgte anhand einer hauseigenen Datenbank (vgl. Howland et al. 2020), die 509 Proteine aus Muttermilch und 10 Keratine enthält. Diese Datenbank umfasste die Proteine, die bei der Suche massenspektrometrischer Daten von direkt bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Muttermilchproben gegen die gesamte humane Datenbank (Uniprot 2019_03) identifiziert wurden. Die Einschränkung wurde vorgenommen, um die Analysezeit der Datenbanksuche zu reduzieren. Da die in der Muttermilch bei der Generierung der Peptide wirkenden Proteasen divers sind, musste die Identifikation mit dem Parameter ‚unspecific cleavage site‘ durchgeführt werden, im Gegensatz zu für den gerichteten proteolytischen Verdauung eines Proteinextraktes sonst üblichen Parameter ‚tryptic cleavage site‘ nach Einsatz von Trypsin.

Die MS-Rohdaten für die verschiedenen Lagerungsbedingungen (fünf Lagerungsbedingungen bei vier Frauen in vier technischen Replikaten; $n = 80$) wurden gegen die hauseigene Proteindatenbank für Muttermilchproteine bzw. -peptide gesucht und mit der Human-Proteom-FASTA-Datenbank verglichen (Uniprot 2019_03). Als Peptid-Massentoleranz wurden 10 ppm, als Fragment-Massentoleranz 0,6 Da gewählt. Als variable Modifikation wurde eine Oxidation am Methionin oder eine Acetylierung am N-terminalen Ende eines Proteins zugelassen.

Nur Peptide mit einer Falschpositivrate von unter 1 % wurden in der weiteren Analyse berücksichtigt. Bioaktive Peptide wurden anhand

der *human milk protein peptide database* annotiert (vgl. Nielsen et al. 2017). Zur Bestimmung von Spaltstellen durch Proteasen wurde die MEROPS-Datenbank verwendet (vgl. Rawlings et al. 2018). Die Analyse der N- und C-terminalen Peptidenden erfolgte über die Suchmaschine ‚WebLogo‘ (<https://weblogo.berkeley.edu/>; vgl. Crooks et al. 2004).

Um den Einfluss der Lagerungsbedingungen auf die Fülle der entstandenen Peptide darzustellen, wurde zunächst eine Eingrenzung auf vierzehn Proteine vorgenommen (siehe Tabelle 3, Anhang 1). Diese Proteine repräsentieren jeweils die zehn Proteine mit den höchsten Intensitäten je Probe. Für diese Proteine wurden die aufsummierten Peptidintensitäten nach Lagerung bei -80 °C und bei Raumtemperatur für 24 h mittels zweiseitigem t-Test über die Mittelwerte der Proteinsignalintensität in den Replikaten pro individueller Muttermilchprobe verglichen.

Die Variation zwischen den Muttermilchproben der verschiedenen Mütter und der Einfluss der Lagerungstemperatur wurden mittels Hauptkomponentenanalyse (HKA) aller identifizierten Peptide pro Probe über die Komponenten ‚Mutter‘ und ‚Lagerungsbedingungen‘ dargestellt.

3. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die publizierten Daten zu den Lagerungsbedingungen von Muttermilchproben zusammengefasst (vgl. Howland et al. 2020). In der vorliegenden Arbeit wurden der Einfluss der Lagerungsbedingungen auf die Zusammensetzung und die Varianz des Muttermilchpeptidoms untersucht. Zusätzlich wurde die Protease-Schnittstellen untersucht, um Rückschlüsse auf den Einfluss der Lagerungsbedingungen auf die Aktivität der in der Muttermilch enthaltenen Proteasen ziehen zu können.

3.1 Einfluss der Lagerungsbedingungen auf die Zusammensetzung des Muttermilchpeptidoms

In den Proben der vier Probandinnen wurde zum Zeitpunkt 1 des Lagerungsversuches eine Gesamtzahl von 3237 verschiedenen Peptiden aus 204 Proteinen identifiziert. Abhängig von der Lagerungsbedingung nahm die Anzahl der Peptide und der daraus identifizierten Proteine leicht ab: 204 bis 201 (−20 °C, 120 h), 188 (4 °C, 6 h), 189 (RT, 6 h) und 187 (RT, 24 h). Peptide von acht weiteren Proteinen wurden erst nach der Lagerung identifiziert, nicht aber in der Kontrollprobe (direkte Lagerung bei −80 °C). Somit wurden insgesamt Peptide von 212 Proteinen gefunden. Obwohl die Anzahlen an Peptiden bei den verschiedenen Lagerungsbedingungen unterschiedlich waren, konnte kein Muster entdeckt werden, das diese Veränderung erklärt. Die Anzahlen der Peptide in den Proben der Probandinnen variierten deutlich (A: 1349, B: 2042, C: 2200, D: 782).

Wie erwartet stammten die meisten Peptide in allen vier Proben vom Protein Beta-Casein (CSN2) ab, insgesamt zwischen 33 % und 72 % der Peptide. In den Proben stammten über 90 % der Peptide von den zehn Proteinen mit der höchsten Abundanz ab. Insgesamt ergab sich daraus eine Summe von vierzehn Proteinen (siehe Tabelle 3 Anhang 1). Andere hoch abundante Peptide gingen aus den Proteinen *alpha S1-casein (CSN1S1)*, *polymeric immunoglobulin receptor (PIGR)*, *butyrophilin subfamily 1 member A1 (BTN1A1)* oder *osteopontin*

(SPP1) hervor. Unterschiede zwischen den Proben zeigten sich bei Peptiden, die von den Proteinen *macrophage mannose receptor 1* (MRC1, Range 0,4 bis 4,1 %) und *complement C4-A* abstammten (C4A, Range 0,1 bis 2,2 %).

Der Anteil der Peptide am Gesamtpeptidom war unabhängig von den verschiedenen Lagerungsbedingungen relativ stabil, mit Ausnahme der Lagerung bei Raumtemperatur für längere Zeit. Hier nahm die Anzahl der Peptide, die vom Beta-Casein abstammten, signifikant zu (10 bis 30 %), während die relative Fraktion von Peptiden aus PIGR, BTN1A1 und MUC1 z. T. um mehr als 50 % abnahm.

3.2 Varianz des Muttermilchpeptidoms aufgrund verschiedener Lagerungsbedingungen

Die Analyse des Einflusses der vier Lagerungsbedingungen auf die Peptidintensität zeigte interindividuelle Effekte zwischen den Proben der vier Probandinnen (A bis D). Die durch die verschiedene Lagerung bedingte Varianz lag zwischen 25,4 % in Milchprobe C und 40 % in Milchprobe A. Die technische Varianz, bedingt durch die Probenverarbeitung und die Messmethode, betrug 15,6 % und die biologische Varianz 56 %. Diese Ergebnisse wurden durch eine mehrstufige Hauptkomponentenanalyse über alle identifizierten Peptide bestätigt.

Des Weiteren ergab die Hauptkomponentenanalyse, dass die Lagerung bei Raumtemperatur für 24 h im Vergleich zu den anderen Lagerungsbedingungen den größten Effekt auf das Peptidmuster der Muttermilchproben hatte (siehe Abbildung 2). Auch in den Muttermilch Proben, die bei $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 6 h gelagert wurden zeigte sich eine erhöhte Peptidsignalintensität. Die Analyse des Effektes der verschiedenen Lagerungsbedingungen auf individuelle Peptide bestätigte dies. In den Proben wurde sowohl eine Zu- als auch eine Abnahme von Peptiden beobachtet. Dennoch verschwand eine Mehrzahl der Peptide, nur wenige Peptide waren erst nach längerer Lagerung bei Raumtemperatur, im Vergleich zu direktem Einfrieren bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$,

sichtbar. Insgesamt zeigten nur wenige Peptide ein konstantes Verhalten über alle Proben hinweg.

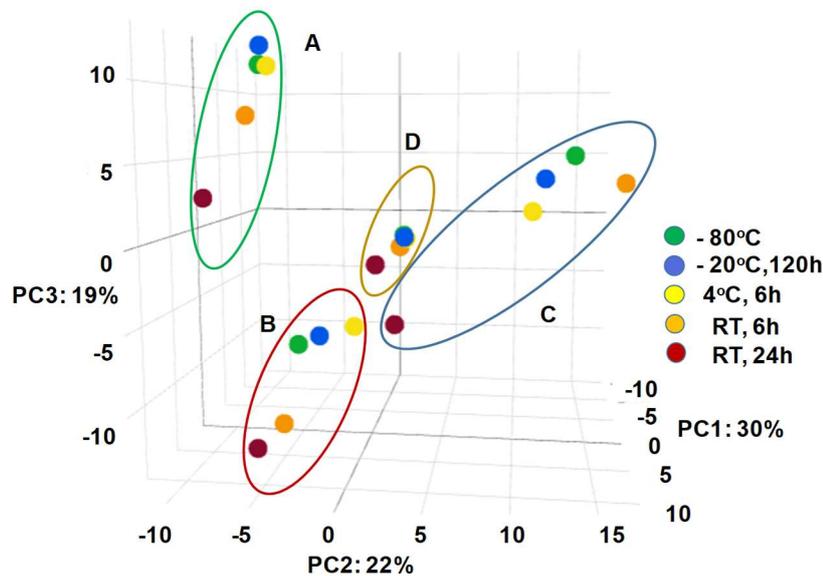


Abbildung 2: **Hauptkomponentenanalyse**

Die Hauptkomponentenanalyse aller Peptide der einzelnen Proben zeigt die große Varianz zwischen den Peptidmustern der einzelnen Muttermilchproben der Probandinnen (A, B, C, D) und dass die Lagerung bei RT für 24 h den größten Effekt auf das Peptidmuster hat (Howland et al. 2020).

3.3 Identifikation von Proteasespaltstellen abhängig von den Lagerungsbedingungen

Zuletzt wurden die Aminosäuren an den N- und C-terminalen Peptidenden identifiziert und verglichen. Hierfür wurden die direkt bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefrorenen Proben und die Proben, die zunächst 24 h bei Raumtemperatur gelagert wurden, analysiert und verglichen. Am N-Terminus der Peptide kamen in den Proben, die bei Raumtemperatur gelagert wurden, die Aminosäuren Glutamat und Aspartat seltener vor als bei den Proben, die direkt eingefroren wurden. Serin und Leucin hingegen waren häufiger enthalten. Am C-Terminus waren Leucin und Prolin in den direkt eingefrorenen Proben die häufigsten Aminosäuren. In den Proben, die 24 h bei Raumtemperatur gelagert wurden, nahm die Anzahl an Leucin und Prolin am C-Terminus sogar noch zu, zusätzlich wurde Glutamat häufig gefunden.

4. Diskussion und Fazit

Ein besseres Verständnis des Muttermilchpeptidoms ist unverzichtbar, um die Ernährung von Neugeborenen zu optimieren und damit auch die Überlebenschancen von Frühgeborenen zu verbessern. Um den Einfluss von Sammelmethoden und Lagerungseffekten auf Muttermilch zu reduzieren, sollten standardisierte Prozedere verwendet werden. Dies erfordert bessere Kenntnisse über den Einfluss der präanalytischen Konditionen auf die Stabilität des Muttermilchpeptidoms. Aktuelle Empfehlungen zur optimalen Lagerungsdauer und Temperatur von Frauenmilch fokussieren sich vor allem auf bakterielle Kontaminationen und die Veränderung von Makronährstoffen (vgl. Weaver et al. 2019; vgl. Eglash et al. 2017). Kenntnisse zum Einfluss von Lagerungs- und Temperatureffekten auf das Muttermilchpeptidom sind nicht nur für die Vergleichbarkeit wissenschaftlicher Studien relevant, sondern auch im klinischen Kontext. Langfristig ist die Frage zu klären, ob durch die derzeitigen Praktiken bei der Verwendung von Spendermilch der maximale Nutzen aus der Muttermilch gezogen wird oder die Lagerung und die Verarbeitung von Muttermilch den Säuglingen schaden.

Die Zeitintervalle, die im Rahmen dieser Studie gewählt wurden, sind realistische Beispiele für die Bedingungen, die in der Häuslichkeit, in Krankenhäusern, beim Sammeln von Muttermilch für Frauenmilchbanken oder während des Transports von Muttermilch für wissenschaftliche Studien vorkommen könnten (vgl. Howland et al. 2020). Es gibt bisher keine vergleichbaren Studien zu Temperatur- und Lagerungseffekten auf das Muttermilchpeptidom.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Verteilung der Peptide über die verschiedenen Lagerungsbedingungen hinweg relativ stabil bleibt, mit Ausnahme der Lagerung bei Raumtemperatur. Die Veränderungen der Peptide sind nach einer Lagerung bei Raumtemperatur über 24 h am größten. Die Auswirkungen, die die lagerungsbedingten Veränderungen im Peptidom auf den Säugling haben, müssen noch genauer untersucht werden. Einerseits ist es denkbar, dass positive

Effekte der bioaktiven Peptide verloren gehen. Andererseits könnten durch die Veränderung der Peptide neue Peptide mit unvorhergesehener Wirkung entstehen, die vom Säugling aufgenommen werden und eventuell einen negativen Einfluss auf dessen Gesundheit haben. Bis diese Frage geklärt ist, sollte dringend dazu geraten werden, das 2019 veröffentlichte Statement der *EMBA* zur Lagerung gespendeter Frauenmilch (vgl. Weaver et al. 2019), in dem vor dem Einfrieren eine Lagerung der Frauenmilch bei Raumtemperatur bis zu 24 h akzeptiert wird, zu ändern und anstelle dessen eine Lagerung bei Raumtemperatur bis maximal 4 h zu empfehlen.

Veränderungen des Muttermilchpeptidoms bei Raumtemperatur können auf das proteolytische System der Muttermilch zurückgeführt werden. Muttermilch hat nicht nur die optimale Nährstoffzusammensetzung, um die Entwicklung des Neugeborenen zu fördern, sondern enthält auch Werkzeuge, um diese Nährstoffe zugänglich zu machen, zum Beispiel die Proteasen Carboxypeptidase B2, Kallikrein, Plasmin, Elastase, Thrombin und Zytosol-Aminopeptidase. Diese Proteasen haben ihr Temperaturoptimum bei Körpertemperatur (vgl. Chan et al. 2021).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass durch Lagerung bei Raumtemperatur im Vergleich zum direkten Einfrieren bei -80 °C einerseits eine Zunahme von Peptiden auftritt. Andererseits gibt es eine große Anzahl an Peptiden, die sich nach der Lagerung bei Raumtemperatur nicht mehr nachweisen lassen und offenbar über die Zeit abgebaut werden.

Die Zunahme der Peptide nach der Lagerung bei Raumtemperatur lässt die Schlussfolgerung zu, dass Proteasen auch bei niedrigeren Temperaturen als 37 °C aktiv sind. Anhand der Muster der Aminosäuren am N- und C-Terminus der Peptide, die die Proteaseschnittstellen widerspiegeln, kann darauf geschlossen werden, dass bei Raumtemperatur in erster Linie Proteasen, die Substrate an den Aminosäuren Arginin, Lysin und Glutamat schneiden, aktiv sind. In Frauenmilch trifft das auf die Proteasen Plasmin und Carboxypep-

tidase B2 zu (vgl. Rawlings et al. 2018). Aber auch das Enzym Thrombin könnte eine Rolle spielen, da nach Lagerung der Muttermilch bei Raumtemperatur vor allem auch die Aminosäure Prolin am Peptid-N-Terminus gefunden wurde, Thrombin aber auch an Arginin und Lysin spaltet.

Das vollständige Verschwinden einer großen Anzahl an Peptiden nach der Lagerung ist wahrscheinlich ebenfalls Folge der proteolytischen Spaltung der Peptide. Die abnehmende Stabilität des Muttermilchpeptidoms bei Raumtemperatur steht im Gegensatz zur Stabilität des Peptidoms in anderen Körperflüssigkeiten. In Blutproben zum Beispiel ist das Peptidom stabiler, wenn die Proben bei Raumtemperatur gelagert werden, da es beim Einfrieren und Auftauen von Blutproben zur Hämolyse kommt, wodurch zusätzliche Proteasen aus den Zellen freigesetzt werden (vgl. Böttger et al. 2017). Ähnliche Vorgänge könnten auch in Muttermilch eine Rolle spielen. Bezogen auf in der Muttermilch enthaltene Proteine ist bekannt, dass Einfrieren von Muttermilch zu einer Reihe physikalischer Veränderungen führen kann, zum Beispiel einer Veränderung von Kaseinmizellen oder dem Aufreißen der *fat globule membrane* und der daraus folgenden Freisetzung der in ihr enthaltenen Proteine (vgl. García-Lara et al. 2012). Ob eine Sekretion zusätzlicher Proteine aus den in der Muttermilch enthaltenen Zellen nach der Lagerung einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Frauenmilch hat, ist noch nicht genauer untersucht worden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass ein kompletter Abbau der Peptide durch Proteasen und die Bindung von Peptiden an Lipide bei der verringerten Peptidsignalintensität eine Rolle spielen (vgl. Dallas et al. 2016).

Die deutliche biologische Varianz der Proben ist unter anderem durch Faktoren wie den Laktationsstatus, das Alter und die Ernährung der Mutter sowie den Gesundheitsstatus und die physische Aktivität von Mutter und Kind bedingt, die auch den Proteingehalt der Muttermilch beeinflussen (vgl. Zhu et al. 2021; vgl. Batista Campanhon et al., 2019). In der vorliegenden Studie standen jedoch die durch die Lagerung hervorgerufenen Veränderungen im Vordergrund, sodass nicht

genauer auf den Einfluss dieser Faktoren eingegangen wird. Es ist jedoch anzunehmen, dass die biologischen Unterschiede im Muttermilchpeptidom einen Einfluss auf die Gesundheit der Neugeborenen haben. So wurde gezeigt, dass psychologischer Stress und Schmerzen während der Geburt zu einem erhöhtem β -Endorphin-Spiegel im Kolostrum reifgeborener Säuglinge führen. β -Endorphin ist ein natürliches, Opiat-ähnliches Peptid, das dem Neugeborenen erleichtert, sich an den durch die Geburt bedingten Stress anzupassen (vgl. Ombra et al. 2008). Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass das Muttermilchpeptidom eine bedeutende Rolle in der Prävention der NEC bei Frühgeborenen spielt (vgl. Wang et al. 2019). In zukünftigen Studien muss daher geklärt werden, wie biologische und soziale Faktoren das Muttermilchpeptidom beeinflussen.

Aktuell laufen an der Universitätsmedizin Greifswald bereits drei Folgestudien zum Einfluss mütterlicher und kindlicher Faktoren auf das Muttermilchpeptidom. Untersucht werden die Auswirkungen von psychischem Stress in der Schwangerschaft zu verschiedenen Laktationszeitpunkten (vgl. Bischoff et al. 2019), der Einfluss von Schwangerschaftsdiabetes sowie Unterschiede im Muttermilchpeptidom von Müttern von frühgeborenen und Müttern von reifgeborenen Kindern.

Bei der vorliegenden Arbeit muss berücksichtigt werden, dass sie die erste Untersuchung zum Einfluss von Lagerungsbedingungen auf das Muttermilchpeptidom ist. Aus diesem Grund ließ sich keine Effektstärke berechnen. Die relativ kleine Probandenzahl (vier Mütter) bewegt sich im Rahmen der Probandenzahl weiterer Peptidomstudien (vgl. Zhu et al. 2021; vgl. Zhou et al. 2019). Ein Vorteil der Arbeit ist, dass die geringe Probandenzahl die Möglichkeit bietet, die Auswirkung der Lagerung auf Einzelproben individueller Mütter zu betrachten anstatt Sammelproben, die von mehreren Müttern stammen, zu untersuchen. Obwohl es in der Peptidomforschung gängige Praxis ist, Sammelproben zu analysieren, sind die biologische Varianz von Muttermilch und die zunehmende Bedeutung der personalisierten Medizin wichtige Argumente für einen Wechsel hin zur Analyse von Einzelproben.

Zuletzt ist im Zusammenhang mit der Verwendung von Frauenmilch im klinischen Alltag zu bedenken, dass sich nach dem Einfrieren von Muttermilch der Nährstoffgehalt verringert und keine lebenden Zellen mehr in ihr enthalten sind (vgl. García-Lara et al. 2012). Es sind weitere Studien notwendig zum Beispiel um zu klären ob eine Lagerung bei 4 bis 6 °C über maximal 42 h könnte einen Kompromiss darstellen, denn bezüglich des Proteoms scheint es nur zu geringen Veränderungen zu kommen (vgl. Zhang et al. 2020). In der vorliegenden Studie fand sich eine etwa 20%ige Abweichung im Vergleich zur Lagerung bei –80 °C. In einer aktuellen Interventionsstudie wird bereits untersucht, ob frische, unpasteurisierte Muttermilch, die innerhalb von 4 h verabreicht wird, einen klinischen Vorteil gegenüber prozessierter und im Tiefkühler gelagerter Muttermilch hat (vgl. Sun et al. 2020).

Zusammenfassend lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse empfehlen, Frauenmilch für Peptidomstudien direkt bei mindestens –20 °C zu lagern oder sie maximal für einen Überbrückungszeitraum von 6 h bei 4 °C zu lagern und im Anschluss bei –80 °C einzufrieren. Im klinischen Umgang mit Muttermilch müssen zusätzlich die negativen Einflüsse der Lagerung bei niedrigen Temperaturen berücksichtigt werden. Von einer Lagerung bei Raumtemperatur bis zu 24 h, die in der aktuellen europäischen Richtlinie zur Lagerung von Spendermilch empfohlen wird, ist jedoch abzuraten.

Literaturverzeichnis

- Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V (o.D.): Leitlinien: Angemeldetes Leitlinienvorhaben Registernummer 024-026, Einsatz und Behandlung von eigener und gespendeter Muttermilch in der Neonatologie, [online] <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/anmeldung/1/II/024-026.html> [abgerufen am 05.06.2022].
- Arslanoglu, Sertac/ Willemijn Corpeleijn/ Guido Moro/ Christian Braegger/ Cristina Campoy/ Virginie Colomb/ Tamas Decsi/ Magnus Domellöf/ Mary Fewtrell/ Iva Hojsak/ Walter Mihatsch/ Christian Mølgaard/ Raanan Shamir/ Dominique Turck/ Johannes van Goudoever (2013): Donor human milk for preterm infants: Current evidence and research directions. In: *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 57 (4), S. 535–542, <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3182a3af0a>.
- Aslebagh, Roshanak/ Devika Channaveerappa/ Brian T. Pentecost/ Kathleen F. Arcaro/ Costel C. Darie (2019): Combinatorial electrophoresis and mass spectrometry-based proteomics in breast milk for breast cancer biomarker discovery. In: Alisa G. Woods/ Costel C. Darie (Hrsg.), *Advancements of mass spectrometry in biomedical research*, 2. Aufl., Cham: Springer, S. 451–467, https://doi.org/10.1007/978-3-030-15950-4_26.
- Ballard, Oliver/ Ardythe L. Morrow (2013): Human milk composition: Nutrients and bioactive factors. In: *Pediatric Clinics of North America* 60 (1), S. 49–74, <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>.
- Batista Campanhon, Isabel/ Márcia Regina Soares da Silva/ Mariana Torquato Quezado de Magalhães/ Russolina Benedeta Zingali/ Flávia Fioruci Bezerra/ Alexandre Guedes Torres (2019): Protective factors in mature human milk: A look into the proteome and peptidome of adolescent mothers' breast milk. In: *British Journal of Nutrition* 122 (12), S. 1377–1385, <https://doi.org/10.1017/S0007114519002447>
- Binns, Colin/ MiKyung Lee/ Wah Yun Low (2016): The long-term public health benefits of breastfeeding. In: *Asia-Pacific Journal of Public Health* 28 (1), S. 7–14, <https://doi.org/10.1177/1010539515624964>.

- Bischoff, Marie/ Vanessa Howland/ Johanna Klinger-König/ Samuel Tomczyk/ Silke Schmidt/ M. Zygmunt/ Matthias Heckmann/ Neltje van den Berg/ B. Bethke/ Juliane Corleis/ Sören Günther/ Kerstin Liutkus/ Ulrike Stentzel/ Alexandra Neumann/ Peter Penndorf/ Tobias Ludwig/ Elke Hammer/ Theresa Winter/ Hans Jörgen. Grabe (2019): Save the children by treating their mothers (PriVileG-M-study) - study protocol: A sequentially randomized controlled trial of individualized psychotherapy and telemedicine to reduce mental stress in pregnant women and young mothers and to improve Child's. In: *BMC Psychiatry* 19 (1), S. 1-15, <https://doi.org/10.1186/s12888-019-2279-0>
- Bode, Lars/ Arjun S. Raman/ Simon H. Murch/ Nigel C. Rollins/ Jeffrey I. Gordon (2020): Understanding the mother- breastmilk -infant "triad." In: *Science* 367 (6482), 1070–1072, <https://doi.org/10.1126/science.aaw6147>.
- Böttger, Roland/ Ralf Hoffmann/ Daniel Knappe (2017): Differential stability of therapeutic peptides with different proteolytic cleavage sites in blood, plasma and serum. In: *PLoS ONE* 12 (6), S. 1–15, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178943>.
- Chan, Lauren E./ Robert L. Beverly/ David C. Dallas (2021): The enzymology of human milk. In: Alan L. Kelly/ Lotte Bach Larsen (Hrsg.), *Agents of change: Enzymes in milk and dairy products*, Cham: Springer, S. 209–243, https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8_9.
- Christian, Parul/ Emily R. Smith/ Sun Eun Lee/ Ashley J. Vargas/ Andrew A. Bremer/ Daniel J. Raiten (2021): The need to study human milk as a biological system. In: *The American journal of clinical nutrition* vol. 113 (5), 1063-1072. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab075>
- Crooks, Gavin E./ Gary Hon/ John-Marc Chandonia/ Steven E. Brenner (2004): WebLogo: A sequence logo generator. In: *Genome Res* 14 (6), 1188–1190. <https://doi.org/10.1101/gr.849004>
- Dallas, David C./ Andres Guerrero/ Nora Khaldi/ Patricia A. Castillo/ William F. Martin/ Jennifer T. Smilowitz/ Charles L. Bevins/ Daniela Barile/ J. Bruce German/ Carlito B. Lebrilla (2013): Extensive in vivo human milk peptidomics reveals specific proteolysis yielding protective antimicrobial peptides. In: *Journal of Proteome Research* 12 (5), S. 2295–2304. <https://doi.org/10.1021/pr400212z>.

- Dallas, David C./ Christina J Smink/ Randall C. Robinson/ Tian Tian/ Andres Guerrero/ Evan A. Parker/ Jennifer T. Smilowitz/ Kasper A. Hettinga/ Mark A. Underwood/ Carlito B. Lebrilla/ J. Bruce German/ Daniela Barile (2015): Endogenous human milk peptide release is greater after preterm birth than term birth. In: *Journal of Nutrition* 145 (3), S. 425–433, <https://doi.org/10.3945/jn.114.203646>.
- Dallas, David C./ Niamh M. Murray/ Junai Gan (2016): Proteolytic systems in milk: perspectives on the evolutionary function within the mammary gland and the infant. In: *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 20, S. 133–147. <https://doi.org/10.1007/s10911-015-9334-3>.
- Donovan, Sharon (2019): Human milk proteins: Composition and physiological significance. In: Sharon Donovan/ M./ J. Bruce German/ Bo Lönnerdal/ Alan Lucas (Hrsg.), *Nestlé Nutrition Institute Workshop Series: Human milk: composition, clinical benefits and future opportunities*, Bd. 90, Basel: Karger, S. 93–101, <https://doi.org/10.1159/000490298>
- Edmond, Karen M./ Charles Zandoh/ Maria A. Quigley/ Seeba Amenga-Etego/ Seth Owusu-Agyei/ Betty R. Kirkwood (2006): Delayed breastfeeding initiation increases risk of neonatal mortality. In: *Pediatrics* 117 (3), S. e380–e386, <https://doi.org/10.1542/peds.2005-1496>.
- Eglash, Anna/ Liliana Simon/ The Academy of Breastfeeding Medicine/ Wendy Brodribb/ Sarah Reece-Stremtan/ Larry Noble/ Nancy Brent/ Maya Bunik/ Cadey Harrel/ Ruth A. Lawrence/ Yvonne LeFort/ Kathleen A. Marinelli/ Casey Rosen-Carole/ Susan Rothenberg/ Tomoko Seo/ Rose St. Fleur/ Michal Young (2017): ABM clinical protocol #8: Human milk storage information for home use for full-term infants. In: *Breastfeeding Medicine* 12 (7), S. 1–6, <https://doi.org/10.1089/bfm.2017.29047.aje>.
- Eidelman, Arthur I./ Richard J. Schanler/ Margreete Johnston/ Susan Landers/ Larry Noble/ Kinga Szucs/ Laura Viehmann (2012): Breastfeeding and the use of human milk. In: *Pediatrics* 129 (3), S. e827–e841, <https://doi.org/10.1542/peds.2011-3552>.
- Ferranti, Pasquale/ Maria Vittoria Traisci/ Gianluca Picariello/ Antonella Nasi/ Velia Boschi/ Mario Siervo/ Claudio Falconi/ Lina Chianese/ Francesco Addeo (2004): Casein proteolysis in human milk: Tracing the pattern of casein breakdown and the formation of potential bioactive peptides. In

- Journal of Dairy Research* 71 (1), S. 74–87, <https://doi.org/10.1017/S0022029903006599>.
- Frauenmilchbank-Initiative (o.D.). Frauenmilchbanken in Deutschland, [online] <https://www.frauenmilchbank.de/frauenmilchbanken-in-deutschland> [abgerufen am 30. Juni 2021].
- García-Lara, Nadia Raquel/ Diana Escuder-Vieco/ Oscar García-Algar/ Javier De La Cruz/ David Lora/ Carmen Pallás-Alonso (2012): Effect of freezing time on macronutrients and energy content of breastmilk. In: *Breastfeeding Medicine* 7 (4), S. 295–301, <https://doi.org/10.1089/bfm.2011.0079>.
- Hahn, Won-Ho/ Seong Phil Bae/ Seunghyun Song/ Suyeon Park/ Joohyun Lee/ Jong-Bok Seo/ Nam Mi Kang (2018): The freeze-drying does not influence the proteomic profiles of human milk. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 33 (12), S. 2069–2074, <https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1538349>.
- Howland, Vanessa/ Maik Klaedtke/ Johanna Ruhnau/ Vishnu M. Dhople/ Hans J. Grabe/ Uwe Völker/ Matthias Heckmann/ Elke Hammer (2020): Impact of storage conditions on the breast milk peptidome. In: *Nutrients* 12 (9), S. 2733. <https://doi.org/10.3390/nu12092733>.
- Nielsen, Søren Drud/ Robert L. Beverly/ Yunyao Qu/David C. Dallas (2017): Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. In: *Food Chemistry* 232, S. 673–682, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.056>.
- Ombra, Maria Neve/ Maria Musumeci/ Jacques Simpore/ Grazia Maria Palano/ Salvatore Musumeci (2008): β -Endorphin concentration in colostrums of Burkinabe and Sicilian women. In: *Nutrition* 24 (1), S. 31–36, <https://doi.org/10.1016/j.nut.2007.09.004>.
- Quigley, Maria/ Nicholas D. Embleton/ William McGuire (2019): Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews* (7), S. 1-74, <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002971.pub5>.
- Rawlings, Neil D./ Alan J. Barrett/ Paul D. Thomas/ Xiaosong Huang/ Alex Bateman/ Robert D. Finn (2018): The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. In: *Nucleic Acids Research* 46

(D1), S. D624–D632, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>.

- Sun, Huiqing/ Yun Cao/ Shuping Han/ Rui Cheng/ Ling Liu/ Jiangqin Liu/ Shiwen Xia/ Jiajie Zhang/ Zhankui Li/ Xiuyong Cheng/ Chuanzhong Yang/ Xinnian Pan/ Long Li/ Xin Ding/ Rensheng Wang/ Mingyuan Wu/ Xiaoying Li/ Liping Shi/ Falin Xu/ Fengqin Yu/ Jiahua Pan/ Xiaolan Zhang/ Li Li/ Jie Yang/ Mingxia Li/ Changhong Yan/ Qi Zhou/ Jiao Lu/ Mou Wie/ Laishuan Wang/ Ling Yang/ Xiang Y. Ye/ Sharon Unger/ Foteini Kakulas/ Shoo K. Lee (2020): A randomized controlled trial protocol comparing the feeds of fresh versus frozen mother's own milk for preterm infants in the NICU. In: *Trials*, 21 (1), S. 170-181, <https://doi.org/10.1186/s13063-019-3981-4>.
- van der Voorn, Bibian/ Marita de Waard/ Johannes B. van Goudoever/ Joost Rotteveel/ Annemieke C. Heijboer/ Martijn J. J. Finken (2016): Breastmilk cortisol and cortisone concentrations follow the diurnal rhythm of maternal hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity. In: *Journal of Nutrition* 146 (11), S. 2174–2179, <https://doi.org/10.3945/jn.116.236349>.
- Victoria, Cesar G./ Rajiv Bahl/ Aluísio J. D. Barros/ Giovanny V. A. França/ Susan Horton/ Julia Krasevec/ Simon Murch/ Mari Jeeva Sankar/ Neff Walker/ Nigel C. Rollins (2016): Breastfeeding in the 21st century: Epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. In: *The Lancet* 387 (10017), S. 475–490, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01024-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01024-7).
- Wada, Yasuaki/ Bo Lönnerdal (2020): Bioactive peptides derived from human milk proteins: An update. In: *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 23 (3), S. 217-222, <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000642>.
- Wang, Xingyun/ Xiangyun Yan/ Le Zhang/ Jinyang Cai/ Yahui Zhou/ Heng Liu/ Yin Hu/ Wenjuan Chen/ Siliang Xu/ Peipei Liu/ Ting Chen/ Juan Zhang/ Yan Cao/ Zhangbin Yu/ Shuping Han (2019): Identification and peptidomic profiling of exosomes in preterm human milk: Insights into necrotizing enterocolitis prevention. In: *Molecular Nutrition and Food Research* 63 (13), S. 1–11, <https://doi.org/10.1002/mnfr.201801247>.
- Weaver, Gilian/ Enrico Bertino/ Corinna Gebauer/ Anne Grovslie/ Radmila Mileusnic-Milenovic/ Sertac Arslanoglu/ Debbie Barnett/ Clair-Yves Boquien/ Rachel Buffin/ Antoni Gaya/ Guido E. Moro/ Aleksandra Wesolow-

- ska/ Jean-Charles Picaud (2019): Recommendations for the establishment and operation of human milk banks in Europe: A consensus statement from the European Milk Bank Association (EMBA). In: *Frontiers in Pediatrics* 7 (53), S. xx, <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00053>.
- Zhang, Liana/ Yanyan Wu/ Yaping Ma/ Zhuangjian Xu/ Ying Ma/ Peng Zhou (2020): Macronutrients, total aerobic bacteria counts and serum proteome of human milk during refrigerated storage. In: *Food Bioscience* 35, S. 100562, <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100562>.
- Zhou, Yahui/ Le Zhang/ Zhangbin Yu/ Aiqing Zhang/ Weimin Wu/ Wenjuan Chen/ Xiangyun Yan/ Heng Liu/ Yin Hu/ Chengyao Jiang/ Yan Xu/ Xingyun Wang/ Shuping Han (2019): Peptidomic analysis reveals multiple protection of human breast milk on infants during different stages. In: *Journal of Cellular Physiology* 234 (9), S. 15510–15526, <https://doi.org/10.1002/jcp.28199>.
- Zhu, Jing/ Kelly A. Dingess (2019): The functional power of the human milk proteome. In: *Nutrients* 11 (8), S. 1–27, <https://doi.org/10.3390/nu11081834>.
- Zhu, Jing/ Kelly A. Dingess/ Marco Mank/ Bernd Stahl/ Albert J. Heck (2021): Personalized profiling reveals donor- and lactation-specific trends in the human milk proteome and peptidome. In: *The Journal of Nutrition* 151 (4), S. 826–839, <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa445>.

Zusammenfassung

Frauenmilch ist die beste Nahrung in den ersten sechs Lebensmonaten. Bioaktive Peptide in der Muttermilch scheinen eine große Rolle bezüglich deren präventiver Wirkung zu spielen. In den letzten Jahren hat sich die Methode der Massenspektrometrie zur Erforschung des Peptidoms rasant entwickelt. Aber es fehlt noch an Grundlagenforschung und einheitlichen Protokollen zur präanalytischen Verarbeitung der Muttermilchproben. Studien sind daher nur bedingt vergleichbar. Nicht nur für die Wissenschaft, sondern auch im klinischen Kontext ist es für den Einsatz von Spenderfrauenmilch erforderlich, den Einfluss verschiedener Lagerungsbedingungen auf das Muttermilchpeptidom zu kennen.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden anhand der Muttermilchproben von vier Spenderinnen vier verschiedene Lagerungsbedingungen mit anschließender Lagerung bei -80 °C , die im klinischen Alltag (Lagerung bei -20 °C für 120 h), beim Transport von Muttermilchproben (Lagerung bei 4 °C für 6 h) oder in der häuslichen Umgebung der Frauen (Lagerung bei Raumtemperatur für 24 h bzw. 4 h) vorkommen, untersucht. Die Proben wurden mit direkt bei -80 °C gelagerten Proben verglichen.

Die Ergebnisse zeigen eine sinkende Anzahl an identifizierbaren Proteinen mit steigender Temperatur. Vor allem nach der Lagerung bei Raumtemperatur über 24 h nahm die Signalintensität vieler Peptide entweder ab oder die Peptide verschwanden komplett. Eine Erklärung könnte sein, dass die in der Muttermilch enthaltenen Proteasen bei Raumtemperatur weiterhin aktiv sind und zur proteolytischen Spaltung der Proteine führen.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist zu empfehlen, Frauenmilch für Peptidomstudien direkt bei mindestens -20 °C zu lagern und im Anschluss bei -80 °C einzufrieren. Im klinischen Umgang mit Muttermilch müssen zusätzlich die negativen Einflüsse der Lagerung bei niedrigen Temperaturen berücksichtigt werden. Von einer bis zu 24-stündigen Lagerung bei Raumtemperatur, ist dringend abzuraten.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

Zuerst geht mein Dank an Professor Matthias Heckmann für die gute Betreuung und Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Doktor Elke Hammer, Doktor Johanna Ruhnau, Mike Klaedtke und Monika Hoyer, die mir stets sowohl fachlich als auch bei der Auswertung und der Analyse der Proben zur Seite standen.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Kollegen aus der Studie ‚PriVileG – M‘ bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Insbesondere danke ich der Landesexzellenzinitiative für die finanzielle Unterstützung und die Förderung des Projektes.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie: meinem Mann Laurens, der mir jederzeit liebevoll zur Seite stand, meinen beiden Kindern Clara und Lars sowie meinen Eltern, die immer an mich geglaubt und mich auf meinem Weg hierher unterstützt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

Anhang

Anhangsverzeichnis

Anhang 1: Tabellen.....	30
Tabelle 1: Zusammensetzung der Lösungen, die zur Äquilibration und Entsalzung genutzt wurden	30
Tabelle 2: Zusammensetzung des Gradienten in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (UPLC)-Elution der Peptide vor der MS-Detektion	31
Tabelle 3: Name, Gen-Name, Funktion und Lokalisation der vierzehn Proteine, welche die zehn abundantesten Peptide in allen Proben repräsentieren	32
Anhang 2: Publikation.....	34

Anhang 1: Tabellen

Tabelle 1: Zusammensetzung der Lösungen, die zur Äquilibrierung und Entsalzung genutzt wurden

Lösung Nr.		100%-ACN	hochreines H ₂ O	5%-AA	100%-AA
1	5%-AA	-	19 000 µl	-	1000 µl
2	100%-ACN	500 µl	-	-	-
3	80%-ACN, 1%-AA	400 µl	-	100 µl	-
4	50%-ACN, 1%-AA	250 µl	150 µl	100 µl	-
5	30%-ACN, 1%-AA	150 µl	250 µl	100 µl	-
6	1%-AA	-	800 µl	200 µl	-
7	Puffer A (2- %-ACN in 0,1%-AA)	10 µl	480 µl	10 µl	

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 2: Zusammensetzung des Gradienten in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (UPLC)-Elution der Peptide vor der MS-Detektion

Laufzeit/Dauer	Anteil Puffer A	Anteil Puffer B
2 min	99 bis 95 %	1 bis 5 %
63 min	95 bis 75 %	5 bis 25 %
25 min	75 bis 40 %	25 bis 60 %
2 min	40 bis 1 %	60 bis 99 %

Quelle: eigene Darstellung

Tabelle 3: Name, Gen-Name, Funktion und Lokalisation der vierzehn Proteine, welche die zehn abundantesten Peptide in allen Proben repräsentieren

Name des Proteins	Name des Gens	Funktion	Lokalisation
<i>Beta-casein</i>	CSN2	Regulation	Extrazellarraum
<i>Polymeric immunoglobulin receptor (PIgR)</i>	PIGR	andere	Bestandteil der Zellmembran
<i>Butyrophilin subfamily 1 member A1 (BT)</i>	BTN1A1	adaptive Immunantwort	Bestandteil der Zellmembran
<i>Complement C4-A (Acidic complement C4)</i>	C4A	adaptive Immunantwort	extrazelluläre Exosomen
<i>Macrophage mannose receptor 1 (MMR)</i>	MRC1	zelluläre Antwort auf Cytokine	Bestandteil der Zellmembran
<i>Alpha-S1-casein</i>	CSN1S1	Hormonantwort	extrazellulärer Raum
<i>Mucin-1 (MUC-1)</i>	MUC1	Stress-Antwort	Bestandteil der Zellmembran
<i>Complement C3</i>	C3	adaptive Immunantwort	extrazelluläre Exosomen
<i>Fibrinogen alpha chain</i>	FGA	adaptive Immunantwort	extrazelluläre Matrix
<i>Kappa-casein</i>	CSN3	Transport	extrazellulärer Raum

<i>Bile salt-activated lipase (BAL)</i>	CEL	Stoffwechsel	Bestandteil der Zellmembran
<i>Osteopontin</i>	SPP1	Hormonantwort	extrazelluläre Exosomen
<i>Perilipin-2 (Adipophilin)</i>	PLIN2	Antwort	Fetttröpfchen
<i>Golgi apparatus protein 1 (CFR-1)</i>	GLG1	Zellmigration	extrazelluläre Matrix

Quelle: Eigene Darstellung

Anhang 2: Publikation

Impact of storage conditions on the breast milk peptidome

Howland, Vanessa/ Maik Klaedtke/ Johanna Ruhnau/ Vishnu M. Dhople/

Hans J. Grabe/ Uwe Völker/ Matthias Heckmann/ Elke Hammer (2020):

In: *Nutrients* 12(9), S. 2733. <https://doi.org/10.3390/nu12092733>.