

Aus dem Institut für Molekulare Kardiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. J. Schrader

Massenspektrometrische Identifizierung extrazellulär phosphorylierter
endothelialer Membranproteine

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von
Wibke Willberg
2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Schrader
Zweitgutachterin: Univ.-Prof. Dr. rer.nat. Margitta Elvers

Diese Arbeit widme ich meinem Vater.

Zusammenfassung

Seit den 1970er Jahren sind auf der Oberfläche von Zellen so gut wie aller Gewebe Ektoproteinkinasen nachgewiesen worden. Die bis heute bekannten Substrate dieser Ektoproteinkinasen umfassen insbesondere lösliche Proteine sowie Proteine der extrazellulären Matrix, während membranständige Substrate kaum untersucht wurden. Um die Funktion von Ektoproteinkinasen insbesondere auch in Hinblick auf ihre membranständigen Substrate näher aufzuklären zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Methoden entwickelt und evaluiert. Damit sollten extrazellulär phosphorylierte Membranproteine als mögliche Substrate von Ektoproteinkinasen auf der Oberfläche von humanen umbilicalen Endothelzellen (*HUVECs*) und einer humanen Leukämiezelllinie (*K562-Zellen*) isoliert und massenspektrometrisch identifiziert werden.

In der ersten Methode wurden extrazellulär phosphorylierte Membranproteine zunächst mit biotinylierten Antikörpern gegen phosphorylierte Aminosäuren (phosphoSerin, phosphoTyrosin, phosphoThreonin) markiert und anschließend mithilfe von Detergenzien aus der Zellmembran gelöst. Die markierten Phosphoproteine wurden daraufhin durch Ausnutzen der Biotin-Streptavidin-Bindung aus dem Überstand isoliert und massenspektrometrisch analysiert. Aufgrund des großen Überstandes an intrazellulären Proteinen im Zelllysats sowie deren unspezifische Bindung an Streptavidin war eine ausreichende Aufreinigung von extrazellulär phosphorylierten Membranproteinen mit dieser Methode jedoch nicht möglich. Mit der empfindlichen Methode der Massenspektrometrie gelang hier kein Nachweis von extrazellulär phosphorylierten Membranproteinen. Es wurde daher eine zweite Methode entwickelt und evaluiert, mit welcher die extrazellulären Domänen sämtlicher Membranproteine von der Zelloberfläche proteolytisch abgespalten wurden. Dabei stellte sich die Protease Bromelain als besonders geeignet heraus. Vorversuche mit den Proteasen Trypsin und Papain hatten eine zu geringe Ausbeute an Proteinen im Überstand und einen zu hohen Anteil an unter der Proteolyse abgestorbenen Zellen ergeben. Anschließend wurden die Phosphopeptide mithilfe der Affinitätschromatographie (IMAC, *Immobilized Metal Affinity Chromatography*) aus dem Überstand isoliert. Es folgte erneut die massenspektrometrische Analyse der isolierten Peptide.

Mithilfe dieser Methoden konnten 4 extrazellulär phosphorylierte Membranproteine auf HUVECs (Notch 1, Otopetrin 1, Regulator of G-protein signalling 13, Protein tyrosine phosphatase receptor type D isoform 3) und 1 extrazellulär phosphoryliertes Membranprotein auf K562-Zellen (Usherin isoform B) massenspektrometrisch identifiziert werden. Diese Proteine sind aufgrund ihrer extrazellulären Phosphorylierungsstellen potentielle Substrate von Ektoproteinkinasen. Sie entsprechen in ihren Funktionen denen von bereits bekannten Substraten von Ektoproteinkinasen (Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktion, Zelldifferenzierung, Angiogenese). Durch Erweiterung der Methode (Einsatz von ATP, Kombination verschiedener Proteasen) könnten zukünftig mithilfe der proteolytischen Abspaltung von Membranproteinen von der Zelloberfläche noch weitere potentielle Substrate von Ektoproteinkinasen identifiziert werden.

Verwendete Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CK	Caseinkinase
DeltaCN	Delta Correlation Value
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPK	Ektoproteinkinase
ESI	Electrospray Ionisation
FCS	Fetal calf serum
FGF	Fibroblast growth factor
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEK-Zellen	Human embryonic kidney cells
hNopp	Human nucleolar phosphoprotein
HPLC	High performance liquid chromatography
HUVECs	Human umbilical vein endothelial cells
IAA	3-Indolessigsäure
IMAC	Immobilized metal affinity chromatography
Ions cov.	Ions coverage
kDa	kiloDalton
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionisation
MHC	Major histocompatibility complex
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
N-CAMs	Neuronal cell adhesion molecules
NGF	Nerve growth factor
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
RGS	Regulator of G-protein signaling
RP-LC	Reverse phase liquid chromatography
RSp	Ranking Preliminary Score
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
Ser	Serin
Sp	Preliminary Score
TBS	Tris buffered saline
TCA	Trichloressigsäure
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
v/v	Volumenanteil
w/v	Massenanteil
XCorr	Cross Correlation Score

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Ektoproteinkinasen: Zellen kommunizieren mit ihrer Umgebung	1
1.1.1 Ektoproteinkinasen im Nervensystem	3
1.1.2 Ektoproteinkinasen auf Thrombozyten	3
1.2 Endothelzellen	6
1.3 Physiologische und pathologisch veränderten Zellen des Immunsystems	8
1.3.1 Ektoproteinkinasen auf Zellen des Immunsystems	8
1.3.2 Ektoproteinkinasen auf maligne veränderten Zellen	9
1.4 Fragestellung	10
2 Material und Methoden	12
2.1 Material	12
2.1.1 Geräte und Gebrauchsgegenstände	12
2.1.2 Chemikalien	14
2.1.3 Gebrauchslösungen und Zellmedien	16
2.1.4 Zellen	18
2.1.5 Antikörper	18
2.1.6 Detergenzien	18
2.1.7 Streptavidinsäule	19
2.1.8 Gelelektrophorese	19
2.1.9 Proteinfärbung	20
2.1.10 Proteasen	22
2.1.11 IMAC (Immobilisierte Metallionenaffinitäts-Chromatographie)	23
2.1.12 HPLC	23
2.1.13 Software und Datenbanken	24
2.2 Zellkultur	24
2.2.1 Human umbilical vein endothelial cells (<i>HUVECs</i>) Präparation	24
2.2.2 K562-Zellen Präparation	26
2.3 Extraktion von Membranproteinen	27
2.3.1 Markieren phosphorylierter Membranproteine mithilfe von Antikörpern	27
2.3.2 Solubilisation der Zellen mithilfe von Detergenzien	28
2.3.3 Extraktion der antikörpermarkierten Proteine aus dem Zelllysat	28
2.3.4 Nachweis der phosphorylierten Proteine mittels Gelelektrophorese und Proteinfärbung	30

2.3.5 Entfärben der Proteine und In-Gel-Trypsinverdau.....	31
2.4 Proteolytische Abspaltung extrazellulärer Domänen von Membranproteinen	32
2.4.1 Abbau von Membranproteinen mithilfe von Proteasen.....	32
2.4.2 Entfernen der Protease durch Größenausschlussfiltration	32
2.4.3 Konzentrieren und Aufreinigen der Peptide.....	33
2.4.4 Anreichern von Phosphopeptiden	33
2.5 Massenspektrometrie	33
2.5.1 NanoLC-ESI-MS	33
2.5.2 Analyse der Massenspektren und Datenbankrecherche	34
3 Ergebnisse	37
3.1 Methode 1: Extraktion von Membranproteinen mithilfe von Detergenzien	38
3.1.1 Vorversuche zur Bindung biotinylierter Antikörper gegen phosphorylierte Aminosäuren an die Zelloberfläche	38
3.1.2 Versuche zur Isolation von Membranproteinen aus der Zellmembran mithilfe von Detergenzien	39
3.1.3 Versuche zur Isolierung phosphorylierter Proteine aus dem Zelllysat.....	47
3.1.4 Versuche zur massenspektrometrischen Identifikation der durch Zellyse isolierten phosphorylierten Membranproteine	52
3.2 Methode 2: Proteolytische Abspaltung extrazellulärer Domänen von Membranproteinen	53
3.2.1 Versuche zum Einsatz verschiedener Proteasen	54
3.2.2 Versuche zur Elimination von Bromelain aus dem Überstand durch Größenausschlussfiltration.....	61
3.2.3 Ergebnisse der proteolytischen Abspaltung extrazellulär phosphorylierter Membranproteine auf HUVECs und K562-Zellen mithilfe von Bromelain	62
4 Diskussion	70
4.1 Isolierung und Identifikation von Ektophosphoproteinen auf HUVECs und K562-Zellen.....	70
4.2 Ektophosphoproteine auf HUVECs und K562-Zellen.....	75
4.2.1 HUVECs.....	75
4.2.2 K562-Zellen.....	78
5 Ausblick	81
6 Literaturverzeichnis	83
Danksagung.....	94
Eidesstattliche Versicherung	95

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Funktionen von Ektoproteinkinasen (EPK)	2
Abb. 2: Phosphorylierte Proteine binden über biotinylierte Antikörper an Streptavidin	29
Abb. 3: Extraktion von Membranproteinen mithilfe von Detergenzien	38
Abb. 4: Bindung biotinylierter Antikörper an die Zelloberfläche	39
Abb. 5: Antigen-Antikörperbindung in Anwesenheit von Detergenzien.....	40
Abb. 6: Proteinausbeute mit n-Butanol	42
Abb. 7: Proteinausbeute mit CHAPS	43
Abb. 8: Proteinausbeute mit Triton X100	44
Abb. 9: Proteinausbeute mit Nonidet P40.....	45
Abb. 10: Proteinausbeute mit Digitonin	46
Abb. 11: Proteinausbeute mit Octyl-Glycopyranosid	47
Abb. 12: Isolierung von Biotin-markierten Phosphoproteinen mithilfe der Streptavidin-Biotin-Bindung	48
Abb. 13: Bindung Biotin-markierter Phosphoproteine an Streptavidin.....	49
Abb. 14: Bindung biotinylierter Antikörper an Streptavidin.....	50
Abb. 15: Bindung von RC 20-markierten Phosphoproteinen an Streptactin	52
Abb. 16: Shaving von Membranpeptiden mithilfe von Proteasen	53
Abb. 17: Peptidausbeute mit Papain	56
Abb. 18: Peptidausbeute mit Papain	57
Abb. 19: Peptidausbeute mit Bromelain - hochmolekular	59
Abb. 20: Peptidausbeute mit Bromelain - niedermolekular	60
Abb. 21: Elimination von Bromelain aus der Probe	61
Abb. 22: SeQuest-Spektrum des Peptides CVDSY*TCTCPAGFSGI.....	65
Abb. 23: SeQuest-Spektrum des Peptides LITLGFGNITTVLDDHT*PQ	65
Abb. 24: SeQuest-Spektrum des Peptides DSY*PRFLKSEMYQKL.....	66
Abb. 25: SeQuest-Spektrum des Peptides EMVKEIS*IPEEVPTG	66
Abb. 26: SeQuest-Spektrum des Peptides FFQVICTT*DEGSVKTPLIQYDT.....	68
Abb. 27: SeQuest-Spektrum des Peptides EMVKEIS*IPEEVPTG	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele für Substrate von Ektoproteinkinasen auf verschiedenen Zellarten und deren	5
Tabelle 2: Identifizierte Peptide und dazugehörige Proteine aus dem Überstand von HUVECs nach dem Zusatz von Bromelain.....	64
Tabelle 3: Identifiziertes Peptid und dazugehöriges Protein aus dem Überstand von K562-Zellen nach Zusatz von Bromelain.....	67
Tabelle 4: Identifiziertes Peptid und dazugehöriges Protein aus dem Überstand von K562-Zellen ohne Zusatz von Bromelain.....	68

1 Einleitung

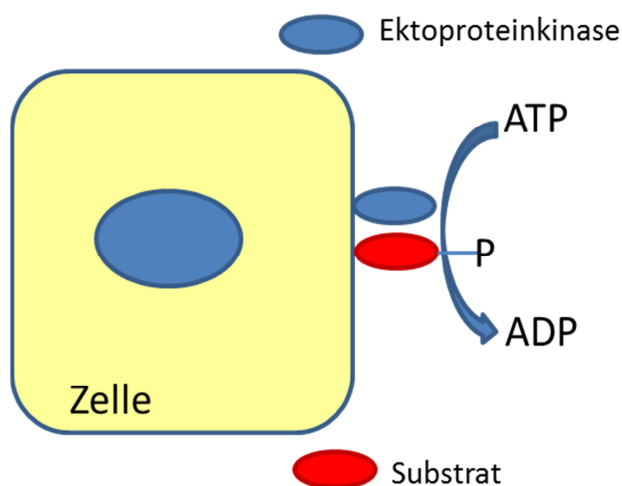
1.1 Ektoproteinkinasen: Zellen kommunizieren mit ihrer Umgebung

Die Kommunikation von Zellen mit ihrer Umgebung in mehrzelligen Organismen findet über die Zelloberfläche statt. Dabei spielen Oberflächenproteine wie z.B. Oberflächenrezeptoren und Ionenkanäle eine zentrale Rolle. Beispiele hierfür sind die Zellproliferation und Zelldifferenzierung nach Stimulation durch Bestandteile der extrazellulären Matrix¹ oder durch Wachstumsfaktoren, wie z.B. während der Stammzelldifferenzierung in komplexeren Geweben², oder die hormoninduzierte Aufnahme von extrazellulären Molekülen, z.B. von Glucose³. Aber auch komplexere physiologische Vorgänge wie z.B. die Plättchen-vermittelte Thrombusbildung⁴ oder die Immunabwehr⁵ werden durch Aussenden von Botenstoffen und deren Bindung an Oberflächenrezeptoren der Zielzelle koordiniert. Schließlich werden auch Vorgänge wie die Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix⁶ oder die Zellmigration^{7,8} durch Oberflächenmoleküle der Zelle gesteuert. In vielen dieser Prozesse spielt die Phosphorylierung von Proteinen durch Proteinkinasen eine wichtige Schlüsselrolle: so besitzt z.B. der Insulinrezeptor selbst eine Kinasefunktion⁹, während andere Signaltransduktionswege in der Phosphorylierung von Zielmolekülen münden^{10,11}. Proteinkinasen als Bestandteil der intrazellulären Signaltransduktion sind seit langem bekannt und gut beschrieben^{12,13}. Viele von ihnen sind als Transmembranproteine oder membranassoziierte Proteine an der Zellmembran verankert und können somit extrazelluläre Signale gut ins Zellinnere zu senden.

Proteinkinasen, welche an der Außenseite der Zellmembran lokalisiert sind, sogenannte Ektoproteinkinasen, phosphorylieren extrazelluläre Domänen von Zellmembranproteinen bzw. extrazelluläre Proteine und wurden erst seit den 1970er Jahren näher erforscht, obwohl sie auf so gut wie allen Zellen in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen worden sind. Nachdem 1968 Yaffe et al. Proteinkinasen in der Plasmamembranfraktion von eukaryotischen Zellen fanden¹⁴, beschrieben Agren et al. als eine der ersten Arbeitsgruppen Ektoproteinkinasen auf Ehrlich-Aszitestumorzellen¹⁵. Der Begriff „Ektoproteinkinase“ wurde 1974 von dePierre und Karnofsky eingeführt¹⁶. Ende der 1970er Jahre wurden Ektoproteinkinasen dann erstmals auf Säugetierzellen

1 Einleitung

nachgewiesen^{17,18}. Eine Charakterisierung der bis dahin bekannten Ektoproteinkinasen führte 1987 die Arbeitsgruppe um W. Pyerin durch¹⁹: die von der Oberfläche von HeLa-Zellen isolierte Proteinkinase ist cAMP-unabhängig, phosphoryliert Phosvitin und Casein an Serin- und Threoninresten und wird nach Bindung an Phosvitin von der Zelloberfläche abgespalten. Insgesamt ähnelt sie der intrazellulären Caseinkinase II. Später, 1989, entdeckte dieselbe Arbeitsgruppe - ebenfalls auf HeLa-Zellen - eine weitere Ektoproteinkinase, welche im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen cAMP-abhängig ist und z.B. das atriale natriuretische Peptid (ANP) phosphoryliert²⁰. Diese Ektoproteinkinase wird nach Bindung an ihr Substrat nicht von der Zelloberfläche abgespalten. Erst 1996 zeigten Walter und Schnolzer, dass die früher beschriebene Ektoproteinkinase aus zwei Anteilen besteht: einer CK-II-ähnlichen Untereinheit und einer weiteren Untereinheit, welche der intrazellulären Caseinkinase I ähnelt²¹. 2005 fanden Rodriguez et al., dass die Caseinkinase II aus dem Zellinneren an die Zelloberfläche transportiert wird und dort als Ektoproteinkinase fungieren kann²². Auch andere Ektoproteinkinasen ähneln bekannten intrazellulären Proteinkinasen: eine Ektoproteinkinase, welche Charakteristika der Proteinkinase C aufweist, wurde 1995 von Hogan et al. auf der Zelloberfläche cerebraler Neuronen beschrieben²³. Eine der Proteinkinase A ähnliche Ektoproteinkinase wurde 1991 von Skubitz et al. auf neutrophilen Granulozyten²⁴ und 1996 von Hatmi et al. auf Thrombozyten²⁵ beschrieben.



Funktionen von Ektoproteinkinasen:

Neuritenbildung und
Nervenzelldifferenzierung²⁶⁻²⁹
Hirnentwicklung²⁷
Plättchenaggregation³⁰⁻³⁴
Zell-Zell-Interaktion³⁵
Zell-Matrix-Adhäsion³⁶⁻⁴⁵
Myogenese^{46,47}
Steuerung der Vasorelaxation⁴⁸
Akrosomreaktion⁴⁹
Akute Phase Reaktion³⁶
Angiogenese^{45,50}
Zellmigration^{38,40}
Antigen-Erkennung und
Immunantwort⁵¹⁻⁵⁵

Abb. 1: Funktionen von Ektoproteinkinasen (EPK)

Aus der Vielfalt der vermuteten Funktionen der Ektoproteinkinasen (vgl. Abb. 1) sollen im Folgenden die bisher am besten erforschten beschrieben werden.

1.1.1 Ektoproteinkinasen im Nervensystem

Ektoproteinkinasen wurden insbesondere von Y.H. Ehrlich et al. untersucht und 1986 erstmals auf der Oberfläche von Nervenzellen beschrieben²⁶. Nachdem u.a. Proteine aus der Gruppe der N-CAMs (*neuronal cell adhesion molecules*) unter den Substraten gefunden wurden, vermuteten diese Autoren, dass die Ektoproteinkinasen eine Rolle in der Regulation der Neuritenbildung und Nervenzelldifferenzierung spielen²⁶. In ähnlicher Weise konnten Tsuji et al. 1988 zeigen, dass Ektoproteinkinasen als Zielmoleküle von Gangliosiden (hier GQ1b) deren stimulierenden Effekt auf das Neuritenwachstum von humanen Neuroblastomzellen vermitteln²⁹. Auch Yamauchi et al. fanden Hinweise auf eine Funktion von Ektoproteinkinasen in der Hirnentwicklung: sie zeigten, dass Neuroglykan C, ein an der Signaltransduktion cerebraler Neuronen beteiligtes Proteoglykan, während der Hirnentwicklung durch Ektoproteinkinasen phosphoryliert wird²⁷. In den Folgejahren wurden immer weitere Funktionen der Ektoproteinkinasen im Nervensystem, wie z.B. die durch extrazelluläres ATP stimulierte Ca^{2+} -Aufnahme (Ehrlich et al.⁵⁶), die ATP-abhängige Wiederaufnahme von Noradrenalin im Synaptischen Spalt (Hendley et al.⁵⁷) und die NGF (*nerve growth factor*)-vermittelte Wachstumsstimulation von Nervenzellen (Pawlowska et al.⁵⁸, Green et al.⁵⁹, Hashimoto et al.⁶⁰), beschrieben. Hogan et al. zeigten außerdem, dass die auf Neuronen des zentralen Nervensystems vorkommenden Ektoproteinkinasen als eine der intrazellulären Proteinkinase C ähnliche Kinase fungieren. Ihre Aktivität ist während der Bildung von Neuriten besonders hoch²³. Außerdem konnten diese Autoren nachweisen, dass Amyloid beta-Peptide, welche mit dem M. Alzheimer in Verbindung gebracht werden, Phosphorylierungsschritte dieser Proteinkinase inhibieren und so zu einer Neurodegeneration führen²³.

1.1.2 Ektoproteinkinasen auf Thrombozyten

Am besten untersucht sind die Funktionen von Ektoproteinkinasen auf Thrombozyten, nachdem hier auch eine Vielzahl von Substraten nachgewiesen werden konnten. Dies ist besonders interessant, da gerade in diesen Zellen die Freisetzung von ATP als Kosubstrat der Ektoproteinkinasen mehrfach beschrieben wurde⁶¹. Soslau et al. beobachteten, dass extrazelluläres ATP die Aggregation von Thrombozyten hemmt, und dass sogar bereits aggregierte Thrombozyten ATP-abhängig desaggregieren⁶². Das ATP wurde dabei teilweise von den Thrombozyten selbst freigesetzt. Diese Beobachtung wurde von Hatmi et al. bestätigt und damit erklärt, dass Thrombozyten eine der Proteinkinase A ähnliche Ektoproteinkinase besitzen, und dass ATP über die Phosphorylierung des Rezeptors CD 36

1 Einleitung

– einer Bindungsstelle für Kollagen und Thrombospondin - an der Steuerung der Plättchenaggregation beteiligt ist²⁵. Schließlich konnten Babinska et al. zeigen, dass Plättchen außerdem eine der Proteinkinase C ähnliche Ektoproteinkinase besitzen, welche durch Phosphorylierung verschiedener Oberflächenproteine auf Thrombozyten die Bindungsfähigkeit des für die Plättchenaggregation notwendigen Fibrinogenrezeptors herabsetzt³³.

Neben der Regulation der Thrombozytenaggregation haben von Thrombozyten freigesetzte *Exoproteinkinasen* (extrazellulär wirkende Proteinkinasen, welche nicht an die Zelloberfläche gebunden sind) auch modulierenden Einfluss auf die komplexen Vorgänge der humoralen Gerinnung. Erstmals beschrieben 1983 Galabru et al. die Phosphorylierung der alpha-Kette von Fibrinogen durch das aus Thrombozyten freigesetzte ATP. Fibrinogen ist das Glied der Gerinnungskaskade, welches nach seiner Spaltung durch Thrombin zu Fibrin wird und die Grundstruktur eines Thrombus bildet⁶³. Weitere Experimente zeigten, dass phosphoryliertes Fibrinogen gegen seine Spaltung durch Plasmin geschützt ist, und dass die durch phosphoryliertes Fibrinogen gebildeten Fibrinbündel eine größere Dicke aufweisen³⁶. Auch die Phosphorylierung weiterer Gerinnungsfaktoren durch Ektoproteinkinasen auf aktivierten Thrombozyten wurde beschrieben: Faktor V und seine aktivierte Form, Faktor Va, welche die Spaltung von Thrombinogen zu Thrombin katalysiert (Ehrlich et al.⁶⁴, Kalafatis et al.³⁰), Faktor VIII (Kalafatis et al.³⁰), Faktor XI, welcher am Anfang der Gerinnungskaskade steht und nach seiner Phosphorylierung deutlich schneller durch Faktor XIIa und Thrombin in seine aktive Form umgewandelt wird (Ekdahl et al.³⁴). Auch gerinnungshemmende Stoffwechselwege werden offensichtlich durch thrombozytäre Ektoproteinkinasen reguliert: wie Seger et al. berichten, wird auch Vitronectin durch *Exoproteinkinasen* phosphoryliert⁴⁵. Vitronectin reguliert durch Bindung an den Plasminogen-aktivator-Inhibitor-1 die Proteolyse von Fibrin. Die phosphorylierte Form von Vitronectin hat eine geringere Affinität zu Plasminogen-aktivator-Inhibitor-1⁶⁵, zudem ist die Spaltung Vitronectin in seiner phosphorylierten Form vor seiner Spaltung durch Plasmin geschützt⁶⁶.

In *Tabelle 1* sind weitere Substrate von Ektoproteinkinasen mit ihren Funktionen (soweit bekannt) zusammengefasst:

1 Einleitung

Tabelle 1: Beispiele für Substrate von Ektoproteinkinasen auf verschiedenen Zellarten und deren Funktionen	
Substrat	Funktion
Epithelzellen und Endothelzellen	
CD98 Oberflächenantigen ³⁵ Kollagen XVII ⁴⁰ ANP (Atriales natriuretisches Peptid) ⁴⁸ Vitronectin ⁴⁵ Fibrinogen ³⁶ Interferon gamma ⁶⁷ CD36 ³⁷	Zell-Zell-Interaktion mit T-Zellen Adhäsion dermalen Zellen an die Dermis Minderung vasorelaxierender Aktivität Zell-Matrix-Interaktion, Zellmigration/Angiogenese Akute Phase Reaktion, Zell-Matrix-Interaktion Funktion nicht bekannt Verminderte Bindung von Erythrozyten an Endothelzellen
Nervenzellen	
N-Cams ²⁶ NeuroglycanC ²⁷ Beta-Amyloide ²³ GQ1b ²⁹	Neuritenbildung, Nervenzelldifferenzierung Hirnentwicklung Neurodegeneration Verstärkte Neurogenese in Neuroblastomzellen
Thrombozyten	
Faktor V und Va ^{30,64} Faktor VIII ³⁰ Faktor XI ³⁴ Rezeptor CD36 ^{31,43} Fibrinogen ³²	Steuerung der Plättchenaggregation Verminderte Konversion von Prothrombin zu Thrombin Vermehrte Sensibilität gegenüber Faktor XIIa und Thrombin Verminderte Aufnahme von Palmitat, verminderte Bindung an Thrombospondin-1 Thrombozytenaggregation, Thrombosebildung
Physiologische und maligne veränderte Immunzellen	
T-Zell-Rezeptor ⁵² Laminin-1 ³⁸ Komplementfaktor C9 ^{68,69} Fas-Rezeptor ⁵¹ FGF (fibroblast growth factor) ³⁹ Phosvitin ⁶⁸	Antigen-Erkennung Zellmigration, Zell-Matrix-Interaktion Schutz vor komplementvermittelter Zellyse Schutz vor Apoptose durch Fas-Rezeptoraggregation Funktion nicht bekannt Funktion nicht bekannt
Myozyten	
112 kDa Protein ⁴⁷	Initiierung der Myogenese und Bildung mehrkerniger Myozytenverbände
Fibroblasten	
Fibronectin ⁴⁴ Latent putative cell growth inhibitor ⁷⁰	Zell-Zell-Interaktion, Zell-Matrix-Interaktion Aktivierung von Wachstumsinhibition
Spermienzellen	
Ecto-MPS ⁴⁹	Akrosomreaktion
Leberzellen	
Major aFGF-stimulated Protein (Autophosphorylierung) ⁷¹	Funktion nicht bekannt
In vitro nachgewiesen	
Interferon gamma ⁶⁷ hNopp140 (human nucleolar phosphoprotein p140) ⁷² Osteopontin und Knochensialoprotein ⁷³	Funktion nicht bekannt Funktion nicht bekannt Funktion nicht bekannt

1.2 Endothelzellen

Endothelzellen entstehen in der 3. Woche der Embryonalentwicklung aus mesenchymalen Vorläuferzellen, den Angioblasten, und kleiden sämtliche Blut- und Lymphgefäße sowie die Herzventrikel aus⁷⁴. Sie bilden jedoch nicht nur eine passive Auskleidung der Gefäßwände, sondern stehen in ständiger Interaktion mit Blutzellen und anderen Blutbestandteilen auf der einen sowie der extrazellulären Matrix der Gefäßwände auf der anderen Seite, und übernehmen auf diese Weise vielfältige Aufgaben, von denen hier einige Beispiele genannt werden sollen:

Barrierefunktion. Die durch das Endothel gebildete Barriere ist in verschiedenen Geweben und Organen unterschiedlich undurchlässig. Im Gehirn bildet ein durch „tight junctions“ fest verbundenes kontinuierliches Endothel die Blut-Hirn-Schranke und verhindert den Durchtritt von Blutbestandteilen in das Hirnparenchym. In Leber, Milz und Knochenmark erlaubt dagegen ein diskontinuierliches Endothel ein Durchwandern von Zellen und anderen Blutbestandteilen durch interzelluläre Lücken. Nieren und endokrine Drüsen besitzen ein gefenstertes Endothel, welches für bestimmte Substanzen permeabel ist und so die Absorption, Sekretion und Filtration von Blutbestandteilen ermöglicht⁷⁴. Erst kürzlich zeigten Chu und Silverstein, dass die Phosphorylierung von CD36 durch Ektoproteinkinasen auf Endothelzellen eine verminderte Bindung von Thrombospondin-1 zur Folge hat⁴³. Thrombospondin-1 ist durch Interaktion mit anderen Zellrezeptoren und Proteinen der extrazellulären Matrix, wie z.B. Integrinen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und extrazellulären Proteasen an der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion beteiligt⁷⁵. In epithelialen Zellen, wie z.B. Keratinozyten, wurde nachgewiesen, dass die Phosphorylierung des Rezeptors Kollagen VII durch Ektoproteinkinasen ihre Adhäsibilität und Motilität steuert⁴⁰.

Beeinflussung der Hämodynamik. Die Aufgaben, die dem Endothel in Bezug auf die Hämodynamik zukommen, wurden von Burnstock in einem Review zusammengefasst⁷⁶. Als Reaktion auf die Scherkräfte des Blutes, die auf das Endothel ausgeübt werden, können sie den Tonus der Gefäßmuskulatur durch Freisetzung vasoaktiver Substanzen (z.B. ATP, NO, Endothelin-1, Acetylcholin, Substanz P) in vielfältiger Weise beeinflussen. Als Langzeitwirkung haben einige dieser Substanzen auch eine trophische Wirkung auf die Gefäßmuskulatur.

Beeinflussung der Plättchenaggregation. Aktiviert durch ATP, welches von Thrombozyten³³, aber auch von Endothelzellen selbst⁶², ausgeschüttet wird, setzen

Endothelzellen, wie oben bereits beschrieben, NO frei⁷⁶. Dies hat neben der Vasodilatation auch die Hemmung der Plättchenaggregation zur Folge⁵⁰. Neben diesen Funktionen konnte auch die Beteiligung von Ektoproteinkinasen an der Expression der Prostaglandin-H-Synthase auf Endothelzellen nachgewiesen werden, welche im Rahmen von Entzündungsvorgängen die Plättchenaktivierung steuert⁷⁷.

Immunologische Aufgaben. Dass Endothelzellen eine wichtige Rolle bei der im Rahmen der Entzündungsreaktion ablaufenden Diapedese von Leukozyten aus Kapillargefäßen spielen, ist seit langem bekannt (1935 Eliot und Eleanor Clark⁷⁸). Heute weiß man, dass die Anhaftung der Leukozyten an Zellen des Endothels durch Zytokine vermittelt wird, die aus Zellen des Immunsystems freigesetzt werden und die Endothelzellen zur Präsentation von Adhäsionsmolekülen (Selektinen und Integrinen) anregen⁷⁹. Darüber hinaus kommt es nach Bindung von Zytokinen durch Endothelzellen zu einer Änderung ihres Zytoskeletts mit Verlust von „tight junctions“, was zu einer Auflockerung des Zellverbandes führt⁷⁹. Auch die Immunzellen, welche an die präsentierten Selektine und Integrine binden, werden durch die Bindung aktiviert und ändern ebenfalls die Struktur ihres Zytoskeletts, was sie zu der Durchwanderung des jetzt durchlässig gewordenen Endothels befähigt⁷⁹. Sie schütten darüber hinaus auch Elastasen, Proteasen und Hyaluronidasen aus, um die Basalmembran und das Bindegewebe durchwandern zu können⁷⁹. Eine weitere mögliche Funktion von Ektoproteinkinasen im Rahmen der Endothelpermeabilität fanden 2005 Ho und Hoang, welche zeigten, dass die Phosphorylierung von CD36 auf durch Ektoproteinkinasen auf Endothelzellen die darüber vermittelte Bindung anderer Zellen, in diesem Falle Erythrozyten, an ihre Oberfläche vermindert³⁷.

Vor dem Hintergrund dieser vielfältigen und komplexen physiologischen Funktionen, an denen die Zelloberfläche von Endothelzellen beteiligt ist, ist es sehr interessant, dass auch Endothelzellen Ektoproteinkinasen tragen: so konnte 1992 von Hartmann und Schrader gezeigt werden, dass endotheliale Zellen der Aorta Ektoproteinkinasen besitzen⁸⁰. Das Vorhandensein von Ektoproteinkinasen auf Endothelzellen wurde 1999 auch von Al-Nedawi und Pawlowska bestätigt, die außerdem zeigten, dass Interferon Gamma durch Ektoproteinkinasen auf HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) phosphoryliert wird⁶⁷. Weitere Substrate von Ektoproteinkinasen auf Endothelzellen sind inzwischen bekannt: 1993 beschrieben Eriksson et al. eine Ektoproteinkinase auf Endothelzellen aus der Rattenleber, welche Fibrinogen phosphoryliert. Da diese Funktion durch eine

thrombinabhängige Freisetzung von ATP aus der Endothelzelle induziert wird, vermuteten diese Autoren einen Zusammenhang mit der akuten Phase Reaktion³⁶. Ein weiteres bekanntes Substrat von Ektoproteinkinasen auf Endothelzellen ist Vitronectin, ein Protein der extrazellulären Matrix, welches beispielsweise auch durch Ektoproteinkinasen auf Thrombozyten phosphoryliert wird³². Seger et al. konnten zeigen, dass die Affinität von Integrinen auf der Oberfläche endothelialer Zellen der Aorta an phosphoryliertes Vitronectin sehr viel stärker ist als an die nicht-phosphorylierte Form, und dass somit die Adhäsion der Endothelzelle an die extrazelluläre Matrix verstärkt wird⁴⁵. Auch die Ausbreitung der Zellen, welche ebenfalls mit einer Bindung von Vitronectin an Integrine verbunden ist, wird durch phosphoryliertes Vitronectin gefördert⁴⁵. Somit könnten Ektoproteinkinasen auf Endothelzellen auch eine wesentliche Funktion sowohl bei deren Adhäsion an die Basalmembran als auch bei der Angiogenese spielen. In eine ähnliche Richtung geht die Entdeckung, dass Kollagen XVII, ein kollagenähnliches Transmembranprotein mit einer Rezeptorfunktion, welches z.B. bei der Bindung von Zellen der Epidermis an die Dermis eine Rolle spielt, durch Ektoproteinkinasen auf Keratinozyten phosphoryliert wird⁴⁰. Dies hat zur Folge, dass die Abspaltung seiner Ektodomäne von Kollagen XVII durch Metalloproteinasen verhindert wird, so dass die Adhäsion und Mobilität epithelialer Zellen reguliert werden kann⁴⁰. Alle diese Substrate könnten auch in der Bindegewebs- und Barrierefunktion von Endothelzellen eine Rolle spielen. Zudem konnte mehrfach gezeigt werden, dass Endothelzellen, ähnlich wie die bereits weiter oben erwähnten Thrombozyten, ATP freisetzen, welches als Kosubstrat für extrazelluläre Phosphorylierungsreaktionen unabdingbar ist^{81,82}. Dennoch ist die Rolle der Ektoproteinkinasen in der komplexen Funktion des Endothels bis heute kaum erforscht.

1.3 Physiologische und pathologisch veränderte Zellen des Immunsystems

1.3.1 Ektoproteinkinasen auf Zellen des Immunsystems

Auch im Immunsystem spielt die Zelloberfläche der beteiligten Zellen eine entscheidende Rolle, sei es bei der Phagozytose von Bakterien und der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen durch das Endothel kleinster Blutgefäße ins Gewebe, der Antigen-Präsentationen durch MHC-II- und MHC-I-Komplexen auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen und ihr Erkennen durch T-Lymphozyten oder der Aktivierung von B-Lymphozyten durch Zytokine. Die ersten Ektoproteinkinasen auf

Zellen des Immunsystems – Makrophagen - wurden 1978 von E. Remold-O'Donnell beschrieben⁸³. Wenige Jahre später entdeckten Emes et al. eine Ektoproteinkinase auf segmentkernigen Leukozyten und diskutierten ihre Funktion auf der Grundlage der bisher im Zusammenhang mit extrazellulärem ATP gezeigten Veränderung der Zellemembran (Erhöhung ihrer Permeabilität, Zellaggregation und Zellmigration)⁸⁴. In den Folgejahren wurden Ektoproteinkinasen auf immer mehr Zellen des Immunsystems gefunden: 1984 beschrieben Kang et al. Ektoproteinkinasen auf der Oberfläche von Meerschweinchenlymphozyten⁸⁵ und wenige Jahre später auch auf natürlichen Killerzellen⁵⁴. Im selben Jahr zeigten Amano et al. Ektoproteinkinasen auf einer Makrophagenzelllinie der Maus⁵³. Dusenbery et al. zeigten 1988 eine Ektoproteinkinase auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten⁸⁶, welche, wie Skubitz et al. zeigen konnten, FGF (*fibroblast growth factor*) phosphoryliert³⁹. Ein weiteres Beispiel sind die Monozyten (Geberhiwot et al.⁸⁷), wobei die genauen Funktionen dieser Ektoproteinkinasen jedoch unklar sind. Nachdem Apasov et al. 1996 Ektoproteinkinasen auf T-Lymphozyten beschrieben hatten, und Lymphozytenoberflächenproteine wie z.B. den für die Antigen-Erkennung wichtigen T-Zell-Rezeptor als ihre Substrate nachwiesen⁵², zeigten Redegeld et al. 1997, dass Ektoproteinkinasen auf zytotoxischen T-Lymphozyten eine wichtige Rolle in der T-Zell-vermittelten Lyse von Zielzellen haben⁸⁸. Die Phosphorylierung des T-Zell-Rezeptors durch Ektoproteinkinasen wurde 1998 durch Sitkovsky bestätigt⁸⁹. Eine weitere Funktion von Ektoproteinkinasen auf Zellen des Immunsystems wurde vor wenigen Jahren von Trachana et al. vermutet³⁸. Diese Autoren konnten nachweisen, dass das Protein Laminin-1, ein Bestandteil der extrazellulären Matrix, von Ektoproteinkinasen auf Monozyten phosphoryliert wird³⁸. Dies erleichtert möglicherweise deren Einwanderung in das Gewebe³⁸.

1.3.2 Ektoproteinkinasen auf maligne veränderten Zellen

Nicht nur auf physiologischen Körperzellen sind Ektoproteinkinasen beschrieben worden, sondern auch auf vielen malignen Zelllinien, da diese sich gut für eine Kultivierung im Labor eignen. 1995 beschrieben Paas und Fishelson zwei Ektoproteinkinasen auf K562-Zellen (einer menschlichen Erythroleukämiezelllinie), HL60-Zellen (einer menschlichen promyelozytischen Leukämiezelllinie) und U937-Zellen (einer menschlichen histiozytischen Leukämiezelllinie⁶⁸). Diese Ektoproteinkinasen werden nach Bindung ihrer Substrate (in diesem Falle Phosvitin) von der Zelloberfläche abgespalten⁶⁸. Auch hier konnten auf einigen Zelllinien sogar Hinweise auf die Funktion dieser Ektoproteinkinasen

gefunden werden: So zeigten Paas und Fishelson auch, dass K562-Zellen den Komplementfaktor C9 phosphorylieren⁶⁸. Dies konnten 2005 Bohana-Kashtan et al. bestätigen, die herausfanden, dass Ektoproteinkinasen auf Zellen eines humanen B-Zell-Lymphoms (Raji-Zellen) sich durch die Phosphorylierung des Komplementfaktors C9 vor einer komplementvermittelten Zellyse schützen können⁶⁹. Eine weitere Funktion von Ektoproteinkinasen auf maligne veränderten Immunzellen zeigten Lautrette et al. 2006: eine Ektoproteinkinase auf Zellen eines humanen T-Zelllymphoms (Jurkat-Zellen) inhibiert durch Phosphorylierung des Fas-Rezeptors die durch eine Bindung des Fas-Liganden vermittelte Signaltransduktionskette, welche zur Apoptose der Zelle führt⁵¹. 2008 fanden Nguyen und Dalmasso, dass Ektoproteinkinasen auf derselben Zelllinie durch Phosphorylierung des Oberflächenrezeptors CD98 die Zell-Zell-Interaktion, die Zelladhäsion und die Zellmotilität der Zellen verstärken³⁵.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die verschiedenen Funktionen der in so gut wie allen Geweben nachgewiesenen Ektoproteinkinasen größtenteils noch im Dunkeln liegen. Ihre Rolle in komplexen physiologischen Vorgängen ist zwar in einigen Fällen bereits bekannt, wird aber in vielen Fällen nur vermutet oder ist völlig unklar. Häufig konnten zwar Target-Proteine der neu entdeckten Ektoproteinkinase nachgewiesen werden, ihre Identifikation gelang jedoch nicht. Bei den Substraten von Ektoproteinkinasen, welche bereits bekannt sind, handelt es sich dagegen häufig um extrazelluläre Proteine, welche nicht an die Zelloberfläche gebunden sind. Dabei wurden die Funktionen neu beschriebener Ektoproteinkinasen, soweit sie bekannt sind, gerade dadurch geklärt, dass es gelang, ihre Substrate zu identifizieren.

1.4 Fragestellung

In dieser Arbeit sollten extrazellulär phosphorylierte Membranproteine als potentielle Substrate von Ektoproteinkinasen von der Zelloberfläche isoliert und anschließend mit den Methoden der Massenspektrometrie identifiziert werden. Auf diese Weise sollte eine Basis geschaffen werden, um die Funktionen von Ektoproteinkinasen weiter aufzuklären. Es konnten wie oben näher ausgeführt bereits spezifische Substrate von Ektoproteinkinasen auf Endothelzellen und Immunzellen identifiziert werden. Der Nachweis dieser Substrate erfolgte überwiegend durch Einsatz eines Ektoproteinkinase-Inhibitors (K252b) und dem Radionuklid [γ^{32} -P]ATP. Es wurde dabei gezielt nach Proteinen gesucht, welche bereits als Substrate von Ektoproteinkinasen vermutet wurden. Zudem wurden überwiegend nicht membranständige Proteine, sondern lösliche Plasmaproteine bzw. Proteine der

1 Einleitung

extrazellulären Matrix als Substrate der Ektoproteinkinasen identifiziert. Auf diese Weise sind bisher nur wenige - und insbesondere nur wenige membranständige - Substrate von Ektoproteinkinasen nachgewiesen worden, wohingegen Ektoproteinkinasen auf Zellen fast aller Gewebe bekannt sind⁹⁰. Daher sollte in der hier vorliegenden Arbeit eine Methode entwickelt werden, mit der membranständige Ektophosphoproteine direkt identifiziert werden können, da diese eine weitere potentielle Gruppe von Substraten der Ektoproteinkinasen darstellen.

Als Zielgewebe diene zum einen das Endothel, welches als Kontaktfläche zwischen Blut und Bindegewebe besonders interessant ist, und auf dessen Oberfläche Ektoproteinkinasen bereits nachgewiesen wurden. Die physiologischen Funktionen dieser Ektoproteinkinasen sind allerdings bisher nur teilweise bekannt (vgl. Kap. 1.2). Als Repräsentanten für endotheliale Zellen kamen in dieser Arbeit HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) zum Einsatz.

Als weiteres Zielgewebe dienten Immunzellen, hier sogenannte K562-Zellen, eine humane Leukämie-Zelllinie, welche eine nicht adhäsiv wachsende Zellpopulation im Unterschied zu den adhäsiv wachsenden HUVECs darstellt. Auch auf diesen Zellen wurden bereits Ektoproteinkinasen und eines ihrer Substrate, der Komplementfaktor C9, nachgewiesen⁶⁸.

Beide Zellarten haben engen Kontakt zum Blut, so dass eine Kenntnis der Funktionen von Ektoproteinkinasen auf ihrer Oberfläche für das Verständnis der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen (wie z.B. der Arteriosklerose oder lokalen bzw. generalisierten Entzündungsreaktionen) aber auch als Zielmoleküle für Pharmaka⁹⁰ von großen Interesse sein könnte.

Um phosphorylierte Membranproteine der Zellmembran dieser beiden Zellpopulationen zu isolieren, wurden zwei Methoden etabliert und miteinander verglichen:

- 1.) Proteolytische Abspaltung von extrazellulärer Domänen von Membranproteinen von der Zelloberfläche mit anschließender Aufreinigung der Phosphopeptide.
- 2.) Markierung phosphorylierter Proteine mittels biotinylierter Antikörper, Lyse der Zellmembran durch Einsatz von Detergenzien und Isolierung von Phosphoproteinen aus dem Zelllysate mittels Streptavidin.

In beiden Fällen erfolgte die Identifizierung der Phosphoproteine mithilfe der Massenspektrometrie

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Gebrauchsgegenstände

A905-Autosampler	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA
Brutschrank	Function line, Heraeus instruments, Hanau, Deutschland
Bunsenbrenner	
Chamber Slides TM (Lap Tek TM)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Chirurgische Fäden	Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland
Chromatographiesäule	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Cryotubes (Falcon TM)	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
Eppendorf-Tubes 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Tubes, siliconbeschichtet, 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Finnigan LTQ 2.4 ESI-MS/MS tandem mass spectrometer	Thermo Scientific, San Jose, CA, USA
Gelektrophoresekammer	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland
Hochdruckbombe	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland
µEttan-microLC-System (HPLC-System)	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA
IMAC-Säule	Quiagen, Hilden, Deutschland
Laserpuller Model P-2000	Sutter Instruments Co., Novato, CA, USA
LoBind-Tubes, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Metalloliven mit Spritzenaufsatz	Aesculab AG und Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Microcon® YM-10	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
Mikroskop Axiovert 35	Zeiss, MicroImaging GmbH, Deutschland

2 Material und Methoden

pH-Indikatorpapier	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pipette Pipetus-Classic	Hirschmann Laborgeräte GmbH und Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Präparierklemme	Aesculap AG und Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Quarzglaskapillare 75 µm ID, 360 µm OD	Polymicro Technologies, Phoenix, USA
Scanner Powerlook III	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA
Schüttler Swip	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Skalpell	Aesculap AG und CO. KG, Tuttlingen, Deutschland
SpeedVac Concentrator	Bachofen GmbH, Weilheim/Teck, Deutschland
Spritze, 20 ml Injekt Luer	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Thermomixer 5437	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultraschallbad Julabo 20B	Julabo, Seelbach, Deutschland
Vliespapier	KimTech, Kimberly-Clark Professional, Roswell, GA, USA
Wasserbad	Memmert Technolab GmbH, Herne, Deutschland
Zellkulturflaschen 25 cm ²	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkultur-Petrischalen	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
6-Loch Zellkulturplatten	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zentrifuge Biofuge 13, Rotor-Nr. 3757	Heraeus instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge für Zellkultur Megafuge 1.0	Heraeus instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge mit Kühlfunktion Biofuge fresco	Heraeus instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (Falcon TM)	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
ZipTipC-18®, Tip Size P10	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland

2 Material und Methoden

2.1.2 Chemikalien

Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Acetonitril	Biosolve, Valkenswaard, Niederlande
Acrylamid-Bis	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ameisensäure	Fluka Biochemika, Steinheim, Deutschland
Ammoniumbicarbonat (NH_4HCO_3)	Fluka Biochemika, Steinheim, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Aqua bidest., max. 18,2 mOhm-cm	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl_2)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Cystein	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxyd)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DTT (Dithiothreitol)	Pharmacia Biotech, München, Deutschland
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
FCS (fetales Kälberserum)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fluoromount TM	SouthernBiotech, Alabama, USA
Formaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Gelatine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2 Material und Methoden

L-Glutamin	Gibco/Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	MP Biomedicals Inc., Ohio, USA
Guanidinium-HCL	Fluka Biochemika, Steinheim, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
IAA (3-Indolessigsäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanolol	Riedel-de-Häen, Seelze, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Riedel-de-Häen, Seelze, Deutschland
Kalium-Ferricyanid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kollagenase Typ CLS II	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Maus anti-Biotin-Antikörper	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Mark 12 TM Molecular weight standard	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Mercaptoethanol	Riedel-de-Häen, Seelze, Deutschland
Methanol	Riedel-de-Häen, Seelze, Deutschland
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	B. Braun, Medical Ag, Sempach-Station, Schweiz
Natriumphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nucleodur C18-Material, 3 µm bzw. 11 µm	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Peroxidase-Substrat-Kit HistoGreen	Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen, Deutschland
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

2 Material und Methoden

Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail for general use	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
S-EDTA-Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Silbernitrat	Riedel-de-Häen, Seelze, Deutschland
Streptavidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
TCA (Trichloressigsäure)	Fluka Biochemika, Steinheim, Deutschland
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris	MP Biomedicals Inc., Ohio, USA
Trypanblau	Riedel-de-Häen, Seelze, Deutschland
S-EDTA-Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin sequencing grade modified	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Vectastain® ABC Kit „Standard“	Vector Laboratories, CA, USA
Ziege anti-Maus-Antikörper	Dako, Hamburg, Deutschland

2.1.3 Gebrauchslösungen und Zellmedien

S-EDTA (S-Ethylendiamintetraacetat)	0,2 g EDTA 8,0 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na ₂ HPO ₄ 0,2 g KH ₂ PO ₄ pH 7,4, ad 1 l Aqua bidest.
Endothelial Cell Basal Medium	Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Endothelial Cell Growth Supplement	Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland

2 Material und Methoden

HBSS (Hank's balanced salt solution)	0,4 g KCl 0,06 g KH_2PO_4 8,0 g NaCl 0,35 g NaHCO_3 0,048 g Na_2HPO_4 1,0 g Glucose pH 7,4, ad 1 l Aqua bidest.
M199-Medium	Gibco Invitrogen Cell Culture, Karlsruhe, Deutschland
PBS (Phosphate buffered saline)	8,0 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na_2HPO_4 0,2 g KH_2PO_4 pH 7,4, ad 1 l Aqua bidest.
Puffermedium für Nabelschnüre	12,27 g NaCl 0,45 g KCl 2,97 g Glucose 4,03 g HEPES pH 7,4, ad 1,5 l Aqua bidest.
RPMI 1640 Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland 2 mM Glutamin 10 % FCS (fetales Kälberserum)
TBS (Tris buffered saline)	8,0 g NaCl 0,2 g KCl 3,0 g Tris pH 7,4, ad 1 l Aqua bidest.

Die Zellmedien sowie das Puffermedium für Nabelschnüre enthielten jeweils 1 % (v/v) Streptomycin (entsprechend 100 $\mu\text{g/ml}$), 1% (v/v) Penicillin (entsprechend 100 U/ml),

2 Material und Methoden

beides Gibco Invitrogen Cell culture, Karlsruhe, Deutschland, 0,1 % (v/v) Amphotericin (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland) sowie ECGS (endothelial cell growth supplement, 50 µg/ml, PromoCell, Heidelberg, Deutschland).

2.1.4 Zellen

HUVECs (Human umbilical vein endothelial cells)	Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Deutschland
---	---

Präparation aus Nabelschnüren, welche freundlicherweise in anonymisierter Form aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Sana Krankenhauses Benrath zur Verfügung gestellt wurden.

K562-Zellen	European Collection of Cell Cultures, Wiltshire, UK
-------------	---

2.1.5 Antikörper

Biotinylierter anti-Phosphoserin-Antikörper	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Biotinylierter anti-Phosphothreonin-Antikörper	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Biotinylierter anti-Phosphotyrosin-Antikörper	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

2.1.6 Detergenzien

n-Butanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
CHAPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Digitonin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Nonidet p40®	Fluka biochemika, Steinheim, Deutschland
n-Octyl-β-D-Glykopyranosid	Calbiochem®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2 Material und Methoden

Triton®-X-100

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen,
Deutschland

Die Detergenzien wurden in einem Reaktionspuffer aus 0,15 M NaCl, 0,01 M Na₃PO₄, 1 % (v/v) Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland), 1 % (v/v) Protease Inhibitor Cocktail for general use (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland), 1 % (w/v) EDTA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), pH 7,4, in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet.

2.1.7 Streptavidinsäule

Äquilibrationspuffer

0,15 M NaCl
0,01 M Na₃PO₄
1 % (w/v) EDTA
pH 7,2, ad PBS (Phosphate buffered saline)

Der Äquilibrationspuffer enthielt zusätzlich eines der folgenden Detergenzien in der angegebenen Konzentration: n-Butanol 50 % (v/v) oder CHAPS 2 % (v/v) oder Digitonin 1 % (v/v) oder Nonidet p40® 1 % (v/v) oder n-Octyl-β-D-Glykopyranosid 1 % (v/v) oder Triton®-X-100 1 % (v/v)

Elutionspuffer

0,1 M Glycin
pH 2,5, ad PBS (Phosphate buffered saline)

Regenerationspuffer

6 M Guanidinium-HCl
pH 2,0, ad PBS (Phosphate buffered saline)

2.1.8 Gelelektrophorese

Laufpuffer für SDS-PAGE

6,04 g Tris
28,8 g Glycin
2,0 g SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)
pH 8,3, ad Aqua bidest.

2 Material und Methoden

Probenpuffer nach Laemmli

2 ml Glycerin
1,15 g SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)
6,25 ml Sammelpuffer (s.u.)
Ad 50 ml Aqua bidest.
Zusatz zu je 1 ml Aliquot:
5 µl Mercaptoethanol
Bromphenolblau

Sammelgel für SDS-PAGE

3,2 ml Acrylamid-Bis
22,75 ml Aqua bidest.
2,0 ml Sammelgelpuffer (s.u.)
0,2 ml SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)
20 µl TEMED
68 µl APS (Ammoniumpersulfat)

Sammelgelpuffer für SDS-PAGE

1,25 M Tris
pH 6,8, ad Aqua bidest.

Trenngel für SDS-PAGE

17,5 ml Acrylamid-Bis
22,75 Aqua bidest.
10,5 ml Trenngelpuffer (s.u.)
0,525 ml SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)
26,25 µl TEMED
0,175 ml APS (Ammoniumpersulfat)

Trenngelpuffer SDS-PAGE

1,8 M Tris
pH 8,8, ad Aqua bidest.

2.1.9 Proteinfärbung

Silberfärbung nach Shevchenko

Entwickler

30 g Na_2CO_3
500 µl Formaldehyd
5 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
Ad 1 l Aqua bidest.
50 ml Essigsäure

2 Material und Methoden

Fixierlösung I

500 ml Methanol
Ad 1 l Aqua bidest.

Fixierlösung II

500 ml Methanol
Ad 1 l Aqua bidest.

Thiosulfat-Reagenz

0,02 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
Ad 1 l Aqua bidest.

Silbernitrat-Reagenz

2 g Silbernitrat
200 μl Formaldehyd
Ad 1 l Aqua bidest.

Proteinfärbung nach Coomassie

Färbelösung

0,02 % CBB-G250
5 % Aluminiumsulfat-18-Hydrat
10 % Ethanol
2 % ortho-Phosphorsäure
Ad Aqua bidest.

Entfärbelösung

10 % Ethanol
2 % ortho-Phosphorsäure
Ad Aqua bidest.

Entfärbung und In-Gel-Trypsinverdau

Alkylierungslösung

55 mM IAA (3-Indolessigsäure)
100 mM NH_4HCO_3
Ad Aqua bidest.

Entfärbelösung I

15 mM Kalium-Ferricyanid
50 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
Ad Aqua bidest.

Entfärbelösung II

100 mM NH_4HCO_3
Ad Aqua bidest.

2 Material und Methoden

Reduktionslösung

10 mM DTT (Dithiothreitol)

100 mM NH_4HCO_3

Ad Aqua bidest.

Trypsinlösung

5 mM CaCl_2

50 mM NH_4HCO_3

20 μg Trypsin (sequenzierung grade modified,
Promega GmbH, Mannheim, Deutschland)

Ad 1,512 ml Aqua bidest.

Waschlösung

50 % (v/v) Methanol

5 % (v/v) Essigsäure

Ad Aqua bidest.

2.1.10 Proteasen

Bromelain 8,79 UN/mg

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen,
Deutschland

Bromelain-Puffer⁹¹

0,1 % (w/v) Bromelain (s.o.)

1 % (w/w) Phosphatase inhibitor for general
use (Sigma-Aldrich)

Ad PBS (Phosphat buffered saline)

Papain 12 UN/mg

Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen,
Deutschland

Papain-Puffer⁹²

1,7 mg Papain (s.o.)

116 mM NaCl

5,4 mM KCl

26 mM NaHCO_3

1 mM NaH_2PO_4

1,5 mM CaCl_2

1 mM MgSO_4

0,5 mM S-EDTA

2 Material und Methoden

25 mM Glucose
1 mM Cystein
Ad 10 ml Aqua bidest.

Trypsin, sequencing grade modified

Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

Trypsin-Puffer⁹³

0,5 mg Trypsin (s.o.)
0,04 mg S-EDTA
Ad 1 ml HBSS

2.1.11 IMAC (Immobilisierte Metallionenaffinitäts-Chromatographie)

Bindungspuffer

5 % (v/v) Essigsäure
pH 2-3,5, ad Aqua bidest.

Waschpuffer I

0,1 % (v/v) Essigsäure
pH 2-3, ad Aqua bidest.

Waschpuffer II

0,8 % (v/v) Essigsäure
20 % Acetonitril
pH 3, ad Aqua bidest.

Elutionspuffer

0,15 M NH_4HCO_3
pH 8,7 – 9,1, ad Aqua bidest.

2.1.12 HPLC

Äquilibrationspuffer

4 % (v/v) Acetonitril
0,1 % (v/v) Essigsäure
Ad Aqua bidest.

Elutionspuffer

84 % (v/v) Acetonitril
0,1 % (v/v) Essigsäure
Ad Aqua bidest.

2.1.13 Software und Datenbanken

Bioworks™ 3.3 (SEQUEST-Algorithmus)	Thermo Scientific, San Jose, CA, USA
Finnigan™ LTQ 2.4	Thermo Scientific, San Jose, CA, USA
Finnigan™ Xcalibur 2.07	Thermo Scientific, San Jose, CA, USA
Human International Protein Index (IPI) database (version 3.87)	Europäisches Institut für Bioinformatik
PhosphoSitePlus® (version 2012)	Cell Signalling Technology® Inc., www.phosphosite.org
Psipred 3.2. (version 2012)	UCL Department for Computer Science, Bloomsbury Center for Bioinformatics, Bioinformatics group, bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/
SPOCTOPUS (version 2008)	Stockholm Bioinformatics Center, Stockholm University, Schweden, octopus.cbr.su.se/index.php
Unicorn 5.01 (HPLC-Programm)	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA
Uniprot (version 136) 2012	UniProt Consortium, www.uniprot.org

2.2 Zellkultur

2.2.1 Human umbilical vein endothelial cells (*HUVECs*) Präparation

Die Präparation von HUVECs war in unserem Labor etabliert, so dass diese Zellreihe als Repräsentant für Endothelzellen verwendet wurde. Sie wurden aus menschlichen Nabelschnüren einer durchschnittlichen Länge von 15-20 cm gewonnen. Die Nabelschnüre wurden vor der Präparation bis zu 4 Tage in einem sterilen Puffermedium mit 1% (v/v)

2 Material und Methoden

Penicillin (100 U/ml) / 1% (v/v) Streptomycin (100 µg/ml) und 0,1 % (v/v) Amphotericin bei 4°C gelagert.

Nach dem Spülen der *V. umbilicalis* mit erwärmtem HBSS (Hank's balanced salt solution) wurden die Endothelzellen durch Instillation einer Kollagenaselösung (10 % (m/v) Kollagenase in HBSS) über eine Metall-Olive mit Spritzenaufsatz, welche mit einer Ligatur an einem Ende der Nabelschnur befestigt wurde, von ihrer Unterlage abgedaut. Die Nabelschnüre wurden an beiden Enden mit arretierten Präparierklemmen verschlossen, um ein Auslaufen der Kollagenase zu verhindern, und für 12 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Nabelschnüre vorsichtig mit Daumen und Zeigefinger geknetet, um die Endothelzellen von ihrer Unterlage zu lösen. Die Kollagenaselösung mit den darin enthaltenen Zellen wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (FalconTM) abgetropft. Die Enzymreaktion wurde daraufhin mit 20 % (v/v) FCS in M199-Medium gestoppt. Nach 8 Minuten Zentrifugation bei 302xG zum Entfernen eventuell noch vorhandener Blutkoagel und Erythrocyten wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und das Pellet erneut in 20 % (v/v) FCS in M199-Medium mit einer Pipette resuspendiert. Bei starker Blutbeimengung wurde der Vorgang wiederholt. Die Zellsuspension wurde daraufhin in gelatinebeschichtete 25 cm² Zellkulturflaschen überführt. Für die Beschichtung wurde 0,1 %-ige Gelatinelösung verwendet. Sie diente der Erleichterung der Adsorption. Nach etwa zwei Stunden Adsorption im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ waren lichtmikroskopisch Zellinseln erkennbar. Nun wurde das Zellmedium gegen Endothelial Cell Basal Medium mit ECGS (endothelial cell growth supplement, 50 µg/ml) ausgetauscht.

Nach ca. 48 Stunden waren die Zellkulturschalen konfluent mit HUVECs bewachsen und wurden, um eine größere Zellzahl zu erhalten und um negative Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen zu vermeiden, auf größere 10 cm Zellkultur-Petrischalen passagiert. Dazu wurde das verbrauchte Zellmedium vorsichtig dekantiert und die Zellen mit 4 ml S-EDTA gespült, um den darauffolgenden Abbau mittels Trypsin zu erleichtern. Für den Abbau wurde 1 ml Trypsin in die Zellkulturflasche gegeben und die Zellen für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Ablösung der Zellen vom Untergrund wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Die Reaktion wurde mit 20 % (v/v) FCS in M199-Medium gestoppt. Daraufhin wurde die Zellsuspension in 15 ml Zentrifugenröhrchen (FalconTM) überführt und für 7 min. bei 209xG zentrifugiert, um Trypsin aus dem Überstand zu entfernen. Nach Dekantieren des Überstands wurde das Pellet in vorgewärmtem M199-Medium aufgenommen und erneut 5 min. bei 209xG zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut

2 Material und Methoden

entfernt und das Pellet daraufhin in 10 ml vorgewärmtem Endothelial Cell Basal Medium mit ECGS (50 µg/ml) mit einer Pipette resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einem Verhältnis von 3:1 auf 5 cm Zellkultur-Petrischalen ausgesät und erneut im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Dabei wurden die Zellen alle 48 Stunden mit frischem Zellmedium versorgt, um sie in ihrer logarithmischen Wachstumsphase zu halten. Die Zellen wurden bis zur 3. Generation passagiert, um einerseits eine ausreichende Zellzahl und andererseits eine im Vergleich zu der Primärkultur weitgehend unveränderte Oberflächenstruktur zu gewährleisten. Das Überleben der Zellen wurde vor Versuchsbeginn mikroskopisch mit Trypanblau bestätigt. Nur die Passagen mit weniger als 2,5 % toten Zellen wurden für die weiteren Versuche eingesetzt, um eine Verunreinigung mit zytoplasmatischen Phosphoproteinen im Überstand zu vermeiden.

2.2.2 K562-Zellen Präparation

K562-Zellen stammen aus einer menschlichen Erythroleukämie-Zelllinie einer Patientin mit chronisch myeloischer Leukämie. Sie wurden in RPMI 1640 Medium mit 2 mM Glutamax (Glutamin, Gibco Invitrogen Cell Culture) und 10 % (v/v) FCS in 25 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Bei einer Kulturgröße von ca. 1×10^6 Zellen/ml (lichtmikroskopisches Auszählen in der Neubauer Zählkammer) wurden die Zellen, um negative Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen zu vermeiden, passagiert. Da die Zellen nicht adhärent wachsen, konnte die gesamte Kultur als Suspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (FalconTM) überführt und für 7 Minuten bei 209xG zentrifugiert werden. Das verbrauchte Medium wurde daraufhin dekantiert und das Pellet in ca. 10 ml vorgewärmtem RPMI 1640 Medium mit 10 % (v/v) FCS mit einer Pipette resuspendiert. Die Zellsuspension wurde daraufhin in einem Verhältnis von 3:1 in 25 cm² Zellkulturflaschen überführt und erneut bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Ein Austausch des verbrauchten gegen frisches Medium fand alle 48 Stunden statt, um die Zellen in ihrer logarithmischen Wachstumsphase zu halten. Vor Versuchsbeginn wurde das Zellüberleben mikroskopisch mit Trypanblau nachgewiesen. Nur die Passagen mit weniger als 2,5 % toten Zellen wurden für die weiteren Versuche eingesetzt, um eine Verunreinigung mit cytoplasmatischen Phosphoproteinen im Überstand zu vermeiden.

Um K562-Zellen ohne weiteres Wachstum für einen späteren Gebrauch zu konservieren, wurde das Zellpellet nach der Zentrifugation in 5 ml FCS und 10 % (v/v) DMSO resuspendiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension in Fraktionen von 1 ml in

2 Material und Methoden

Cryotubes (FalconTM) bei – 80 °C eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur erneuten Verwendung wurden die Cryotubes unter der Sterilbank vorsichtig in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, wobei darauf geachtet wurde, dass der LoBind Deckel und der obere Teil der Tubes nicht mit Wasser benetzt wurde, um eine Kontamination zu verhindern. Die Cryotubes wurden daraufhin mit 70 % Ethanol gereinigt. Die Zellsuspension wurde in 15 ml vorgewärmtes RPMI 1640 Medium mit 2 mM Glutamax und 10 % (v/v) FCS überführt und in einer 25 cm² Zellkulturflasche bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Ein erster Wechsel des Zellmediums fand nach 48 Stunden statt.

2.3 Extraktion von Membranproteinen

2.3.1 Markieren phosphorylierter Membranproteine mithilfe von Antikörpern

Die HUVECs wurden zunächst auf Chamberslides ausgesät (vgl. dazu *Kap. 2.2.1*), welche zur Erleichterung der Adsorption mit 0,1% Gelatine beschichtet waren. Die Adsorption erfolgte während einer ca. zweistündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank und wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Die Markierung der K562-Zellen erfolgte zur leichteren Handhabung, da mehrere Zentrifugationsschritte notwendig waren, in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen. Für beide Zellreihen wurde eine Konzentration von ca. 5×10^6 Zellen pro Kammer/Eppendorfgefäß verwendet. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an Oberflächenproteine der Zellen zu verhindern, wurden die Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur in 2 ml 5 % BSA (bovines Serumalbumin) in TBS blockiert. Das Zellmedium wurde dazu mit einer Pipette abgezogen bzw. im Falle der K562-Zellen 7 min. bei 8176xG abzentrifugiert. Nach dem Blockieren wurden die Zellen noch einmal in 0,8 % BSA in TBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem biotinkoppelten Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 in 0,8 % BSA in TBS für 48 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln, da Biotin nicht lichtstabil ist. Verwendet wurde ein Volumen von 400 µl Antikörpersuspension pro Ansatz.

In einem Vorversuch wurden die Antikörper nach der Inkubation auf der Zelloberfläche mithilfe der Meerrettichperoxidasereaktion sichtbar gemacht. Verwendet wurde hierzu das Vectastain ABC Kit „standard“ (PK-4000, Vector Laboratories), eine Meerrettichperoxidase, welche über die Biotin-Avidin-Bindung an die biotinylierten Antikörper bindet, sowie das Peroxidase-Substratkit HistoGreen (E109, Linaris-biologische Produkte, Wertheim-Bettingen, Deutschland). Die Zellen wurden zunächst jeweils dreimal 5 Minuten, wie oben beschrieben, in PBS gewaschen. Es folgten 5 Minuten

2 Material und Methoden

Inkubation bei Raumtemperatur in jeweils 625 µl der Vectastain-Reaktionslösung, welche nach Angaben des Herstellers angesetzt worden war. Anschließend wurden die Zellen erneut jeweils dreimal 5 Minuten in PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Zellen mit jeweils 125 µl der Histogreen-Reaktionslösung direkt unter dem Lichtmikroskop, um die Reaktion zu überwachen. Nach 1-5 Minuten wurden die Zellen erneut für dreimal 6 Minuten mit PBS gewaschen. Die Auswertung erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Die HUVECs wurden anschließend mit Fluoromount-G (Fa. Southern Biotechnology) eingedeckt und für einige Stunden trocknen gelassen.

2.3.2 Solubilisation der Zellen mithilfe von Detergenzien

Verwendet wurden HUVECs bzw. K562-Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml. Die phosphorylierten Membranproteine der Zellen wurden zunächst wie in *Kap. 2.3.1* beschrieben mit biotinylierten Antikörpern markiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen für 45 min. bei Raumtemperatur mit den folgenden Detergenzien in den unten angegebenen Konzentrationen:

n-Butanol 50 % (v/v)

CHAPS 2 % (v/v)

Digitonin 1 % (v/v)

Nonidet p40® 1 % (v/v)

n-Octyl-β-D-Glykopyranosid 1 % (v/v)

Triton®-X-100 1 % (v/v)

Die Detergenzien wurden in einem Reaktionspuffer aus 0,15 M NaCl, 0,01 M Natriumphosphat, 1 % (w/v) EDTA, pH 7,4, in PBS unter Zusatz von 1% Phosphatase- und Proteaseinhibitoren (jeweils Fa. Sigma) eingesetzt. Der n-Butanol-Ansatz wurde nach der Lyse für 1 min. bei 2943xG zentrifugiert, anschließend wurde mit der wässrigen Phase weitergearbeitet, in der die höhere Konzentration von Membranproteinen vermutet wurde.

2.3.3 Extraktion der antikörpermarkierten Proteine aus dem Zelllysat

Um die phosphorylierten, mit einem biotinylierten Antikörper markierten Membranproteine aus dem Zelllysat zu extrahieren wurden Streptavidin-Agarose-Beads verwendet, an denen die phosphorylierten Membranproteine über die daran gebundenen biotinylierten Antikörper binden sollten (s. *Abb. 2*). Um die Aktivität der bei der Zelllyse freigesetzten intrazellulären Phosphatasen möglichst gering zu halten, erfolgte die Extraktion an der Streptavidinsäule bei 4 °C im Kühlraum.

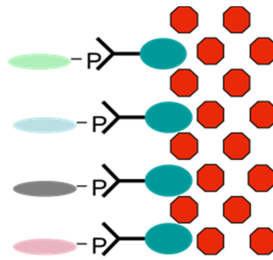


Abb. 2: Phosphorylierte Proteine binden über biotinylierte Antikörper an Streptavidin

Die Zusammensetzung der im Folgenden genannten Pufferlösungen ist in *Kap. 2.1.7* aufgeführt. Zunächst wurde die Streptavidinsäule mit einem Äquilibrationpuffer unter Zusatz der entsprechenden Konzentration des in der Probe verwendeten Detergenz äquilibriert. Dazu wurde die Säule zweimal mit 5 ml des Äquilibrationpuffers geladen. Der Durchfluss wurde in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon ®) aufgefangen. Anschließend wurde die Säule mit dem Zelllysats geladen. Der Durchfluss wurde in 2,0 ml LoBind-Tubes (Eppendorf) aufgefangen. Um alle nicht an die Streptavidin-Säule gebundenen Anteile des Zelllysats zu entfernen, folgte nun ein Waschschriff mit 5 ml des oben genannten Äquilibrationpuffers, diesmal ohne Zusatz von Detergenzien. Auch diese Waschfraktion wurde in 2,0 ml LoBind-Tubes (Eppendorf) aufgefangen. Nun wurden die über die Biotin-Streptavidinbindung an die Säule gebundenen phosphorylierten Membranproteinen eluiert. Dazu wurde die Antigen-Antikörperbindung der biotinylierten Antikörper an die phosphorylierten Membranproteine gespalten. Die Säule wurde mit 3 ml eines glycinhaltigen, stark sauren Elutionspuffer gespült. Die Eluatfraktion wurde in 1,5 ml LoBind-Tubes (Eppendorf) aufgefangen, und, um ein Ausfallen der Proteine zu verhindern und den darauffolgenden Trypsinverdau zu ermöglichen, sofort mit 1 M Tris, pH 9, in PBS auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Dies wurde unter Zuhilfenahme von pH-Indikatorpapier kontrolliert. Nach dieser Prozedur wurde die Biotin-Streptavidin-Bindung mit 5 ml des Guanidinium-HCl-haltigen Regenerationspuffers gespalten. Auch diese Regeneratfraktion wurde in LoBind-Tubes aufgefangen. Vor dem Laden der nächsten Probe wurde die Säule daraufhin erneut mit zweimal 5 ml des entsprechenden Äquilibrationpuffers äquilibriert.

2.3.4 Nachweis der phosphorylierten Proteine mittels Gelelektrophorese und Proteinfärbung

Für die nachfolgende Gelelektrophorese wurden die Proteine aus der Wasch- und Eluatfraktion zunächst mit TCA (Trichloressigsäure) gefällt. Dazu wurden die Proben zunächst in Aliquots von je 1 ml in LoBind-Tubes (Eppendorf) gegeben. Anschließend wurden sie 1:1 mit 72 %iger TCA gemischt und für 30 min. bei -20°C inkubiert. Um Puffer und TCA aus der Suspension zu entfernen folgte die Zentrifugation bei 16089xG für 15 min. bei 4°C in einer Zentrifuge mit Kühlfunktion. Anschließend wurden die Pellets zweimal mit -20 °C kaltem Aceton durch Resuspension gewaschen und erneut wie oben angegeben zentrifugiert. Die Pellets wurden nach Abpipettieren des Acetons bei 37°C getrocknet. Für die anschließende Gelelektrophorese wurden Pellets in jeweils 15 µl Probenpuffer nach Laemmli resuspendiert und 10 min. bei 95°C gekocht. Um die phosphorylierten Proteine nach ihrem Molekulargewicht zu trennen, wurde eine SDS-PAGE nach Laemmli (1970) durchgeführt. Dazu wurde ein Gel mit 10 %igem Polyacrylamidgehalt gegossen. Die Anfertigung der benötigten Elektrophoresegele und –puffer erfolgte wie oben angegeben (vgl. *Kap. 2.1.8*). Die Proteine wurden für 4 h bei 125 mA getrennt. Anschließend wurden die Proteine mit verschiedenen Färbemethoden sichtbar gemacht.

Silberfärbung der Proteine nach Shevchenko: Zu der Zusammensetzung der im Folgenden aufgeführten Reaktionslösungen vgl. *Kap. 2.1.9*. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Proteingele wurden zunächst für 20 min. in Fixierlösung I inkubiert, anschließend in Aqua bidest. auf dem Schüttler gewaschen, und danach für zweimal 10 min. in Fixierlösung II inkubiert. Nach 10 min. Waschen in Aqua bidest. folgte 1 min. Inkubation in Thiosulfat-Reagenz. Danach wurden die Gele erneut für dreimal 20 sec. in Aqua bidest. auf dem Schüttler gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung für 20 min. in Silbernitrat-Reagenz. Nach 5—10 min. in der Entwicklerlösung wurde die Reaktion mit 5 % (v/v) Essigsäure in Aqua bidest. gestoppt. Die fertigen Gele wurden mit dem Amersham Pharmacia Biotech Powerlook III Scanner digitalisiert.

Proteinfärbung nach Coomassie: Die Coomassie-Färbung erfolgte entsprechend einem modifizierten Protokoll nach Kang et al. (Bull. Korean Chem. Soc., 2002, 23,11). Zu der Zusammensetzung der im Folgenden aufgeführten Reaktionslösungen vgl. *Kap. 2.1.9*. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Proteingele wurden zunächst für 2 x 10 min. in Aqua bidest. gewaschen und anschließend auf dem Schüttler für ca. 3 h in der

Färbelösung gefärbt. Nach der Färbung wurden die Gele erneut in Aqua bidest. gewaschen und anschließend für 10 – 60 min. in der Entfärbelösung entfärbt. Nach der Entfärbung wurden die Gele erneut in Aqua bidest. gewaschen. Die fertigen Gele wurden mit dem Amersham Pharmacia Biotech Powerlook III Scanner digitalisiert.

2.3.5 Entfärben der Proteine und In-Gel-Trypsinverdau

Vor der Analyse der elektrophoretisch aufgetrennten Phosphoproteine erfolgte deren Entfärbung und In-Gel-Trypsinverdau. Die zu verdauenden Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel getrennt und in 1-2 mm² große Stücke geschnitten. Die Stücke wurden in siliconbeschichtete Eppendorf-Tubes (0,5 ml) überführt. Die Zusammensetzung der im Folgenden zur Entfärbung und zum In-Gel-Trypsinverdau eingesetzten Reaktionslösungen ist im *Kap. 2.1.9* angegeben. Alle Schritte erfolgen bei Raumtemperatur. Die Gelstücke wurden in der Waschlösung über Nacht und anschließend zweimal über 15 min. in Aqua bidest. gewaschen. Es folgte die Entfärbung der Gelstücke jeweils für 15 min. in 40 µl der Entfärbelösung I und anschließend in 80 µl der Entfärbelösung II. Der letzte Schritt wurde mind. dreimal wiederholt bis die Gelstücke keine gelbe Färbung mehr aufwiesen. Danach wurden die Gelstücke für 45 min. im SpeedVac Concentrator getrocknet.

Für den anschließenden In-Gel-Verdau der Proteine wurden die Proben nach dem Entfärben reduziert und alkyliert. Die Zusammensetzung der im Folgenden genannten Reaktionslösungen ist in *Kap. 2.1.9* angegeben. Die Proben wurden zunächst für 15 min. in 40 µl einer DTT-haltigen Reduktionslösung bei 56 °C inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Es folgte die Inkubation für 30 min. in 40 µl der Alkylierungslösung im Dunkeln. Nach der Inkubation wurden die Gelstücke in 40 µl einer Lösung aus 100 mM Ammoniumbicarbonat (NH₄HCO₃) in Aqua bidest. gewaschen. Nach 5 min. wurden 40 µl Acetonitril dazugegeben und der Ansatz für weitere 15 min. inkubiert. Die Gelstücke wurden dann für 45 min. im SpeedVac Concentrator getrocknet.

Zunächst wurden die Gelstücke anschließend mit Trypsin geladen, ohne den Proteinverdau zu initiieren. Die Gelstücke wurden dafür zunächst in 40 µl Trypsinlösung rehydratisiert und 45 min. bei 4 °C inkubiert. Um einen Selbstverdau von überschüssigem Trypsin zu vermeiden wurde nach vollständiger Rehydratisierung der Gelstücke der Lösungsüberstand abpipettiert und verworfen. Die Proben wurden anschließend mit Trypsinpuffer ohne Trypsin überschichtet. Um den Verdau zu starten, wurden die Ansätze nun für 16 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde daraufhin abpipettiert und in siliconbeschichtete Eppendorf-Tubes (0,5 ml) überführt, um ein

Anhaften eventuell freiwerdender Peptide an der Gefäßwand zu verhindern. Für die darauf folgende Extraktion der Peptide aus dem Gel wurde den Gelstücken eine Lösung aus 25 mM Ammoniumbicarbonat (NH_4HCO_3) zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 min. kräftig geschüttelt und anschließend 5 min. im Ultraschallbad inkubiert. Der Überstand wurde ebenfalls in Eppendorf-Tubes (0,5 ml) überführt. Anschließend wurden 20 μl einer 5 %igen (v/v) Ameisensäurelösung auf die Gelstücke gegeben. Die Gelstücke wurden erneut zunächst 10 min. kräftig geschüttelt und anschließend für 5 min. im Ultraschallbad inkubiert. Der Überstand wurde erneut in Eppendorf-Tubes (0,5 ml) überführt und der letzte Schritt ab Zugabe der Ameisensäure wiederholt. Die in den Überständen befindlichen Peptide wurden daraufhin für die Analyse im Massenspektrometer über Nacht im SpeedVac Concentrator einkonzentriert.

2.4 Proteolytische Abspaltung extrazellulärer Domänen von Membranproteinen

2.4.1 Abdau von Membranproteinen mithilfe von Proteasen

Verwendet wurden Kulturen von HUVECs bzw. K562-Zellen in einer Konzentration von jeweils $0,5 - 1,5 \times 10^6$ Zellen/ml auf 6-Well-Platten bzw. in 1 ml-Eppendorf-Tubes. Zunächst wurden die Zellen 10 Minuten auf dem Schüttler auf niedriger Stufe in auf 37°C vorgewärmtem PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation in den in *Kap. 2.1.10* aufgeführten Enzympuffern bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank für 45 min. Das Vorgehen richtete sich dabei nach einem Protokoll von E. Muzig et al.⁹¹. Anschließend folgte die Zentrifugation der Ansätze mit den K562-Zellen für 7 Min. bei $2044 \times g$. Die Überstände aus dem HUVEC-Zell-Ansatz wurden vorsichtig dekantiert. Die Überstände sowohl aus den Ansätzen mit K562-Zellen als auch mit HUVECs wurden daraufhin bei $13817 \times g$ zentrifugiert, um restliche Zellen zu entfernen.

2.4.2 Entfernen der Protease durch Größenausschlussfiltration

Es wurden Zentrifugenröhrchen mit eingesetztem Filter mit der Porengröße von 10 kDa (Microcon YM-10 der Fa. Sigma) verwendet. Nach Tränken des Filters mit PBS wurden alle 10 min. 0,5 ml der Überstände aus dem Proteinverdau geladen und durch jeweils 1 min. Zentrifugation bei $13817 \times g$ gefiltert. Das Filtrat wurde in LoBind-Tubes aufgefangen und mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 2-3 eingestellt.

2.4.3 Konzentrieren und Aufreinigen der Peptide

Um die Peptide für die Massenspektrometrie zu konzentrieren und zu entsalzen wurde anschließend eine Festphasenextraktion durchgeführt. Verwendet wurde die ZipTip C-18 von Millipore, bei der sich die feste Phase in einer 10 µl Pipettenspitze befindet. Zum Waschen des Chromatographiematerials wurde Methanol verwendet. Die Äquilibration wurde mit einer Lösung aus 4 % (v/v) Acetonitril und 0,1 % (v/v) Essigsäure in Aqua bidest. durchgeführt, die Elution mit einer Lösung aus 84 % (v/v) Acetonitril und 0,1 % (v/v) Essigsäure in Aqua bidest. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Anschließend wurde die Eluatfraktion im SpeedVac Concentrator getrocknet.

2.4.4 Anreichern von Phosphopeptiden

Die Phosphopeptide wurden in der Probe durch IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) angereichert. Nach Änderung des Herstellerprotokolls zur Optimierung der Anreicherung von Phosphopeptiden wurden die in *Kap. 2.1.11* genannten Puffer verwendet. Anschließend wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Die Elutionsfraktion wurde mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 2-3 eingestellt und vor ihrer massenspektrometrischen Analyse im SpeedVac Concentrator getrocknet.

2.5 Massenspektrometrie

2.5.1 NanoLC-ESI-MS

Das Vorgehen basierte auf Vorversuchen mit der massenspektrometrischen Analyse von Phosphopeptiden von Fr. Dr. Simon-Buss aus unserem Institut. Verwendet wurde ein µEttan-HPLC-System (Amersham Pharmacia Biotech), welches an ein ESI-MS/MS Tandem-Massenspektrometer (LTQ, Thermo Scientific) gekoppelt war. Die Proben wurden mit dem A905-Autosampler (Amersham Pharmacia Biotech) in das HPLC-System geladen. Das HPLC-System (µEttan-microLC-System) war dabei über ein ESI-Interface an das Finnigan LTQ 2.4 ESI-Massenspektrometer gekoppelt. Als ESI-Interface diente eine selbst hergestellte RP-C18-Trennsäule (s. unten).

HPLC (high performance liquid chromatography): Zunächst wurde eine Quarzglaskapillare (75 µm ID, 360 µm OD) für die HPLC auf eine Länge von 20 cm zurechtgeschnitten. Der Polyimid-Mantel wurde anschließend in der Mitte der Kapillare auf einem ca. 2-3 cm langen Stück mit einem Bunsenbrenner abgeflämmt und mit Ethanol mithilfe eines staubfreien Tuchs gereinigt. An dieser Stelle wurde die Kapillare mit einem Laserpuller in zwei Hälften getrennt, so dass eine Spitze mit einem Durchmesser von 1 µm

ID entstand. Die Kapillare konnte so als Ionenquelle für die ESI-MS dienen. Die Kapillare wurde anschließend in einer Hochdruckbombe (30 bar) mit einer Suspension aus C18-Material in 30% (v/v) Isopropanolol und 70 % Methanol geladen, zunächst mit einer Blockierungsphase (11 μm) von ca. 1 cm, dann mit der Bindungsphase (3 μm) über die gesamte Länge der Kapillare. Das C18-Material wurde daraufhin in der Hochdruckbombe getrocknet. Die phosphorylierten Peptide wurden in einem Äquilibrationspuffer (vgl. *Kap. 2.1.12*) suspendiert und über den A905-Autosampler auf die HPLC-Säule geladen. Verwendet wurde ein μ Ettan-HPLC-System der Fa. Amersham. Die gebundenen Peptide wurden zunächst durch den Äquilibrationspuffer (vgl. *Kap. 2.1.12*) bei einer Flussrate von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. über 20 min. entsalzt und anschließend durch einen 80minütigen ansteigenden Acetonitril-Gradienten fraktioniert eluiert und online im ESI-Massenspektrometer analysiert.

ESI (Elektrospray-Ionisation) und Ionentransfer: Um ein stabiles Spray und bestmöglichen Ionenstrom in das Massenspektrometer zu erreichen, wurden die folgenden manuell einstellbaren Parameter an der Ionenquelle verwendet:

Spannung an der Ionenquelle	2,4 kV
Kapillartemperatur	100°C
Kapillarspannung	38 V
Spannung an der Linse ("Tube lens")	245 V

Der Ionentransfer zum Analysator erfolgte anschließend mit Hilfe eines Druck- und Spannungsgradienten durch zwei Quadrupole und einen Octapol, wobei der Ionenstrahl gebündelt wurde. Zur Analyse der Phosphopeptide wurde die Finnigan LTQ 2.4 verwendet, eine 2-D lineare Quadrupol-Ionenfalle.

2.5.2. Analyse der Massenspektren und Datenbankrecherche

Die Identifikation der phosphorylierten Peptide aus den mit der FinniganTM Xcalibur-Software generierten Spektren erfolgte mit dem SeQuest-Algorithmus (Eng JK, McCormack AL, Yates JR, 1994 J Am Soc Mass Spectrom 5 (11): 976–989), welcher einen theoretischen Verdau aller Proteine in der durchsuchten Datenbank (in diesem Falle der human International Protein Index (IPI) database (version 3.87) des Europäischen Instituts für Bioinformatik) durchführt und die theoretischen anschließend mit den experimentellen MS/MS-Spektren abgleicht. Dieser Algorithmus war eine Komponente

2 Material und Methoden

des im Institut verwendeten Programms Bioworks™ 3.3 der Firma Thermo Electron Co. Es wurden dabei die folgenden Suchparameter verwendet:

DeltaCN	> 0,1
XCorr	1,0
XCorr vs. Charge state	1,50; 2,00; 2,50 bzw. 3,00 für 1-, 2-, 3- bzw. 4-fach geladene Ionen
Number of top matches	2
Peptide probability	0,05
Peptide tolerance	2,0
Fragment ions tolerance	1,0
Missed cleavage sites	2

Zudem wurden folgende mögliche Modifikationen angegeben:

+ 79.966311	für eine Phosphorylierung an Serin, Threonin oder Tyrosin
+ 57.021464	für eine Carboxyamidomethylierung an Cystein
+ 15.994920	für eine Oxidation an Methionin

Um die Wahrscheinlichkeit, dass ein Protein korrekt identifiziert wurde, einzuschätzen, wurden alle Parameter der Übereinstimmung der theoretischen Spektren mit den experimentellen MS/MS-Spektren berücksichtigt. Dabei wurden folgende Richtwerte angenommen:

Sp (Preliminary Score): nach einem ersten Suchlauf werden die 500 Peptide mit der besten Übereinstimmung der Spektren durch SeQuest ausgewählt. Ein guter Score lag bei mindestens 200, wobei kürzere Peptide niedrigere Werte erreichen als lange.

RSp (Ranking Preliminary Score): entspricht der Platzierung des Peptids unter diesen besten 500. Die Platzierung sollte möglichst nahe bei 1 liegen.

XCorr (Cross-Correlation Score): der Wert der Kreuzkorrelation der Peptide mit der besten Übereinstimmung. Ein Wert von 1,5 entspricht einer möglichen, von über 2,5 einer guten und über 3,5 einer sehr guten Übereinstimmung.

Δ CN (Delta Correlation Value): entspricht dem Unterschied in der Übereinstimmung der Spektren zwischen dem besten und dem nächstbesten Treffer. Dieser Wert sollte größer als 0,1 sein.

Ions Coverage (Ionen-Abdeckung): die Übereinstimmung der Ionen aus dem theoretischen und dem experimentellen Spektrum sollte möglichst hoch sein. Dabei sollten die übereinstimmenden Ionen möglichst zusammenhängenden Aminosäuresequenzen entsprechen.

Die weitere Datenbankrecherche erfolgte für Peptide mit einer Wahrscheinlichkeit ($P(\text{prep})$) von mindestens $1e^{-004}$. Allgemeine Informationen über das zugehörige Protein wurden über die Datenbank Uniprot (version 136) eingeholt. Für Informationen über die von uns nachgewiesene Phosphorylierungsstelle erfolgte eine Recherche der Datenbank Phosphosite, zudem wurden die Algorithmen Psipred 3.2 und SPOCTOPUS für die Berechnung von Transmembrandomänen eingesetzt. Nur, wenn das identifizierte Peptid nach mindestens zwei verschiedenen Algorithmen (Uniprot, Psipred oder SPOCTOPUS) in der extrazellulären Domäne eines Membranproteins lokalisiert war, wurde das entsprechende Protein als extrazellulär phosphoryliert in die Ergebnisse einbezogen.

3 Ergebnisse

Um extrazellulär phosphorylierte Membranproteine als mögliche Substrate von Ektoproteinkinasen auf Endothelzellen zu identifizieren, wurden zwei Methoden zur Gewinnung von Membranproteinen aus der Zellmembran und zur anschließenden Anreicherung von Phosphoproteinen bzw. -peptiden entwickelt und eingesetzt. Dabei sollte zwischen einer intra- und extrazellulären Phosphorylierung der isolierten Proteine unterschieden werden.

Methode 1: Extrazellulär phosphorylierte Membranproteine wurden mit spezifischen biotinylierten Antikörpern gegen phosphorylierte Aminosäuren (phosphoSerin, phosphoThreonin und phosphoTyrosin) markiert. Anschließend wurden sämtliche Membranproteine mithilfe von Detergenzien aus der Zellmembran gelöst. Die Anreicherung der markierten Phosphoproteine aus dem Zelllysate erfolgte dann mittels Streptavidin-Agarose-Beads, an welche die Biotinreste der Marker-Antikörper binden.

Methode 2: Die extrazellulären Domänen sämtlicher Membranproteine wurden proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten. Die Anreicherung der extrazellulären Phosphopeptide aus dem Überstand erfolgte durch die immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC).

Die Identifikation der extrazellulär phosphorylierten Membranproteine erfolgte bei beiden Methoden mithilfe der Massenspektrometrie.

Als Repräsentanten für Endothelzellen wurden HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) verwendet. Als weitere Zelllinie wurden K562-Zellen, eine menschliche Erythroleukämie-Zelllinie, eingesetzt. Auf beiden Zellarten waren Ektoproteinkinasen und extrazellulär phosphorylierte Proteine bereits beschrieben worden^{68,94}. Für die Versuche wurden logarithmisch wachsende Zellen verwendet.

3.1 Methode 1: Extraktion von Membranproteinen mithilfe von Detergenzien

Extrazellulär phosphorylierte Membranproteine wurden mit spezifischen biotinylierten Antikörpern gegen phosphorylierte Aminosäuren (anti-phosphoSerin-Biotin, anti-phosphoThreonin-Biotin und anti-phosphoTyrosin-Biotin) auf intakten Zellen markiert. Anschließend wurden sämtliche Membranproteine mit Hilfe von Detergenzien aus der Zellmembran gelöst. Die Isolierung der markierten Proteine aus dem Zelllysate erfolgte durch Bindung der biotinylierten Antikörper an Streptavidin-Agarose-Beads (s. Abb. 3).

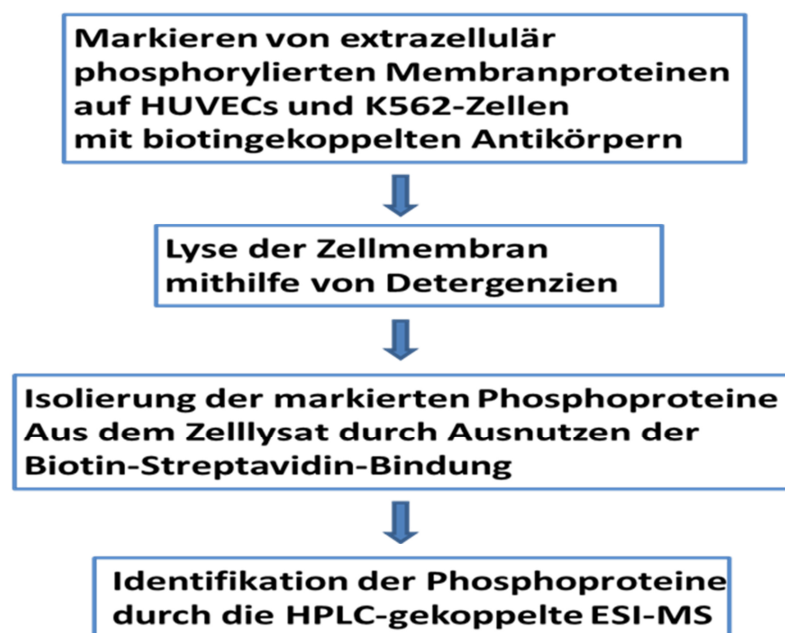


Abb. 3: Extraktion von Membranproteinen mithilfe von Detergenzien

Überblick über die im Folgenden ausgeführte Methode zur Isolierung von antikörpermarkierten extrazellulär phosphorylierten Membranproteinen aus der Zellmembran durch Zelllyse und Ausnutzen der Biotin-Streptavidin-Bindung

3.1.1 Vorversuche zur Bindung biotinylierter Antikörper gegen phosphorylierte Aminosäuren an die Zelloberfläche

Um extrazelluläre Phosphorylierungsstellen von Membranproteinen zu markieren, wurden spezifische biotinylierte Antikörper gegen phosphorylierte Aminosäuren eingesetzt. Zunächst sollte nachgewiesen werden, dass diese Antikörper tatsächlich an die Zelloberfläche von HUVECs und K562-Zellen binden. Zu diesem Zweck wurden jeweils $0,5 \times 10^6$ konfluent gewachsene HUVECs ($n=2$) auf Chamberslides bzw. jeweils $0,5 \times 10^6$ K562-Zellen ($n = 2$) in Eppendorf-Tubes mit jeweils einem der biotinylierten Antikörper

3 Ergebnisse

anti-phosphoSerin-Biotin, anti-phosphoThreonin-Biotin oder anti-phosphoTyrosin-Biotin (Verdünnung 1:100) inkubiert (siehe *Abb. 4*).

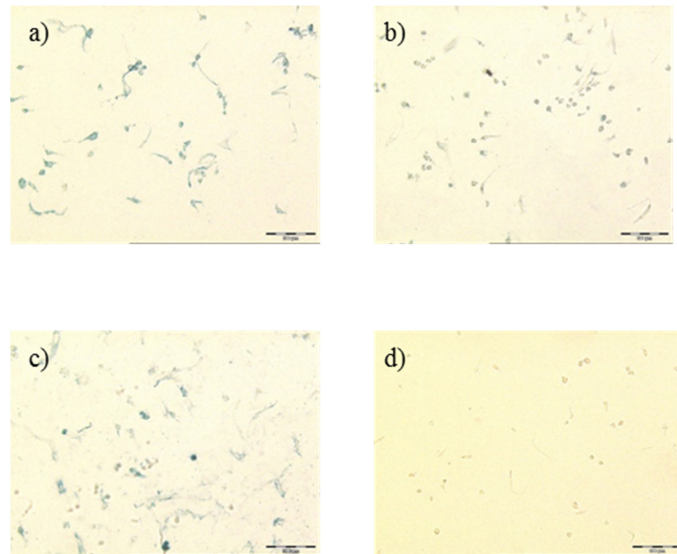


Abb. 4: Bindung biotinylierter Antikörper an die Zelloberfläche

Biotinylierte Antikörper gegen phosphoSerin (a), phosphoThreonin (b) und phosphoTyrosin (c) auf der Oberfläche von HUVECs. d) zeigt die Kontrolle ohne Zugabe von Antikörpern. Die blaue Färbung der Zelloberfläche in a-c entstand durch eine Meerrettichperoxidasereaktion einer an die Biotingruppe der Antikörper gekoppelten Meerrettich-peroxidase.

Abbildung 4 zeigt eine repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme von HUVECs nach Fixation der Zellen und Anfärben der drei oben genannten Antikörper mithilfe einer an die Biotingruppe gekoppelten Meerrettichperoxidase (Vectastain ABC-Kit „Standard“ Fa. Vector Laboratories). In allen drei Fällen kommt es zu einer Blaufärbung der Zelloberfläche, die in der Negativkontrolle nicht nachweisbar ist. Alle drei Antikörper können folglich an die Zelloberfläche von HUVECs binden. Der lichtmikroskopische Nachweis von biotinylierten Antikörpern auf der Zelloberfläche von K562-Zellen war nicht möglich, da diese nicht adhärent wachsenden Zellen durch die Fixation vollständig lysiert wurden.

3.1.2 Versuche zur Isolation von Membranproteinen aus der Zellmembran mithilfe von Detergenzien

Nach ihrer Markierung mit spezifischen Antikörpern gegen phosphorylierte Aminosäuren sollten sämtliche Membranproteine durch Lyse der Zellmembran mithilfe eines Detergenz isoliert werden. Ein geeignetes Detergenz sollte folgende Eigenschaften besitzen:

3 Ergebnisse

Die Antigen-Antikörper-Bindung der biotinylierten Antikörper an die phosphorylierten Aminosäuren durfte nicht durch das Detergenz zerstört werden, da sonst die Unterscheidung zwischen einer intra- und extrazellulären Phosphorylierung nicht mehr möglich wäre. Die Zellmembran sollte zuverlässig lysiert werden, um eine möglichst große Proteinausbeute zu erzielen.

a) Versuche zur Stabilität der Antigen-Antikörper-Bindung in Anwesenheit von Detergenzien

Zunächst sollte gezeigt werden, dass die Antigen-Antikörper-Bindung durch die Zugabe von Detergenzien nicht gespalten wird. Dazu wurden Komplexe aus einem Erstantikörper (anti-Biotin-Cy3, hergestellt in der Maus, Fa. Sigma) und einem Zweitantikörper (anti-Maus-FITC, Fa. Sigma) gebildet. Diese wurden dann in verschiedenen Konzentrationen verschiedener Detergenzien für 30 Minuten inkubiert. Folgende Detergenzien wurden verwendet: Triton X100 1 % (v/v), 0,5 % (v/v) und 0,25 % (v/v) sowie Nonidet P40 1 % (v/v), 0,5 % (v/v) und 0,25 % (v/v). Nonidet P40 lysiert die Zellmembran effektiv, Triton X100 ist darüber hinaus gut mit der Massenspektrometrie kompatibel⁹⁵. Nach der Inkubation wurde eine Gel-Elektrophorese auf 7,5%igen nativen PAGE-Gelen (ohne Zusatz von SDS) durchgeführt. Um eine Zerstörung der Antikörper-Antikörper-Komplexe zu verhindern, wurden die Proben zuvor nicht hitzedenaturiert.

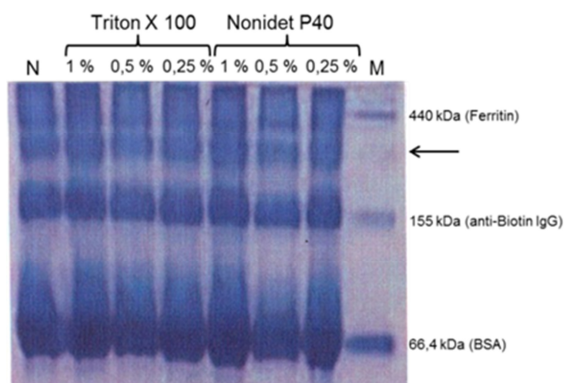


Abb. 5: Antigen-Antikörperbindung in Anwesenheit von Detergenzien

N = Negativkontrolle; M = Molekulargewichtsmarker; Der Pfeil markiert die komplexierten Antikörper bei 300 kDa; *kDa* = Kilodalton. Komplexe aus anti-Biotin-Ak (Maus) und anti-Maus-Ak (Ziege) (s. Pfeil) wurden in Detergenzien in verschiedenen Konzentrationen inkubiert, um ihre Stabilität zu untersuchen. Die Negativkontrolle zeigt die Antikörper-Antikörper-Komplexe ohne Zusatz eines Detergenz. In allen Fällen lassen sich Antikörper-Antikörper-Komplexe nachweisen (erkennbar an einer Bande bei 300 kDa, s. Pfeil). Die Proteine Ferritin, IgG und BSA dienen als Größenmarker.

3 Ergebnisse

Abbildung 5 zeigt, dass die Antikörper-Antikörper-Komplexe sowohl in der Kontrolle ohne Detergenz als auch nach Zugabe von Triton X 100 bzw. Nonidet P40 in verschiedenen Konzentrationen nicht zerstört werden (erkennbar an der Bande bei ca. 300 kDa, s. Pfeil). Die Bande bei 150 kDa entspricht nicht gebundenen freien Antikörpern (anti-Biotin-Cy3 bzw. anti-Maus-FITC), die Bande bei 66,4 kDa entspricht dem in der Herstellerlösung der Antikörper enthaltenen BSA.

b) Versuche zur Proteinausbeute mit verschiedenen Detergenzien

Um ein Detergenz zu finden, mit dem die Zellmembran effektiv und schonend lysiert werden kann, so dass eine möglichst hohe Proteinausbeute erzielt werden konnte, wurden Detergenzien in verschiedenen Konzentrationen getestet, die mit einer Analyse im ESI-MS kompatibel sind⁹⁵: N-Butanol, CHAPS, Triton X100, Nonidet P40, Digitonin sowie Octylglycopyranosid. Die Ergebnisse werden im Folgenden vorgestellt.

Ergebnisse der Versuche mit n-Butanol: n-Butanol gehört in die Gruppe der organischen Alkohole. Es ist schlecht in Wasser löslich und bildet daher in einer wässrigen Lösung ein biphasisches System. In höheren Konzentrationen werden hydrophobe Interaktionen an der Oberfläche der Zellmembran aufgebrochen und ersetzt und so die Membranproteine gelöst. Um die Proteinausbeute nach der Zelllyse mit n-Butanol zu untersuchen, wurden HUVECs auf konfluent bewachsenen Petrischalen (n=2) mit biotinylierten Antikörpern gegen phosphorylierte Aminosäuren markiert (vgl. *Kap. 3.1.1*). Anschließend erfolgte die Inkubation für 30 min. mit n-Butanol 30 % (v/v) bzw. 50 % (v/v) in einem Puffer aus 0,15 M NaCl, 0,01 M Natriumphosphat, 1 % EDTA, 1 % Phosphataseinhibitor und 1 % Proteaseinhibitor (jeweils Fa. Sigma) in 2 ml PBS bei Raumtemperatur. Die markierten Proteine wurden anschließend durch Bindung des Biotinrestes der Antikörper an Streptavidin-Agarose-Beads aus dem Zelllysats isoliert und elektrophoretisch aufgetrennt.

Abbildung 6 zeigt die phosphorylierten Proteine im Westernblot bzw. nach der Silberfärbung. Es zeigen sich im Westernblot einige Banden zwischen 40 und 100 kDa, in der Silberfärbung sind Banden über 70 kDa am stärksten ausgeprägt. Insgesamt lassen sich mit einer höheren Konzentration von n-Butanol (50 % (v/v)) mehr Proteine isolieren. Diese sind überwiegend an der Aminosäure Threonin phosphoryliert, wie der Einsatz eines gegen phosphoryliertes Threonin gerichteten Antikörpers (A) zeigt. Der Einsatz eines gegen phosphoryliertes Serin gerichteten Antikörpers (B) ergibt eine schwächere Bande, mit

3 Ergebnisse

einem Antikörper gegen phosphoryliertes Tyrosin (nicht dargestellt) ließen sich keine Proteine nachweisen. Da die Banden über 70 kDa, welche sich in der Silberfärbung zeigen, im Westernblot nicht nachzuweisen sind, muss es sich hierbei um nicht-phosphorylierte Proteine handeln.

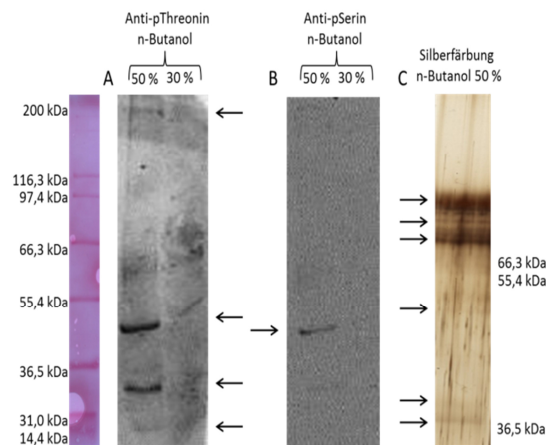


Abb. 6: Proteinausbeute mit n-Butanol

HUVECs wurden mit 30 bzw. 50 % (v/v) n-Butanol lysiert. Die markierten extrazellulär phosphorylierten Membranproteine wurden mithilfe von Streptavidin-Agarose-Beads aus dem Überstand isoliert und elektrophoretisch auf einem 7,5 %igen Laemmliigel aufgetrennt. kDa = Kilodalton

A Nachweis der Phosphoproteine im Westernblot mithilfe eines Antikörpers gegen phosphoryliertes Threonin.

B Nachweis der Phosphoproteine im Westernblot mithilfe eines Antikörpers gegen phosphoryliertes Serin.

C Silberfärbung der Phosphoproteine

Ergebnisse der Versuche mit CHAPS: CHAPS ist ein Gallensäurederivat mit einer zwitterionischen Kopfgruppe, welches Membranproteine durch Bildung gemischter Mizellen aus der Zellmembran löst. Das Protein wird dabei nicht denaturiert. CHAPS wird in der Literatur in Konzentrationen bis 2% (w/v) zur Solubilisation von Membranproteinen aus einer Lipidmembran eingesetzt⁹⁶. Um die Proteinausbeute nach der Zelllyse mit CHAPS zu untersuchen, wurden HUVECs auf konfluent bewachsenen Petrischalen (n=2) mit biotinylierten Antikörpern gegen phosphorylierte Aminosäuren markiert (vgl. Kap. 3.1.1) und anschließend für 30 min. mit CHAPS 1 % (v/v) bzw. 2 % (v/v) inkubiert (zum Vorgehen vgl. *Ergebnisse der Versuche mit n-Butanol* weiter oben). Die phosphorylierten Membranproteine wurden anschließend durch Bindung an Streptavidin-Agarose-Beads aus dem Zelllysats isoliert und elektrophoretisch aufgetrennt.

3 Ergebnisse

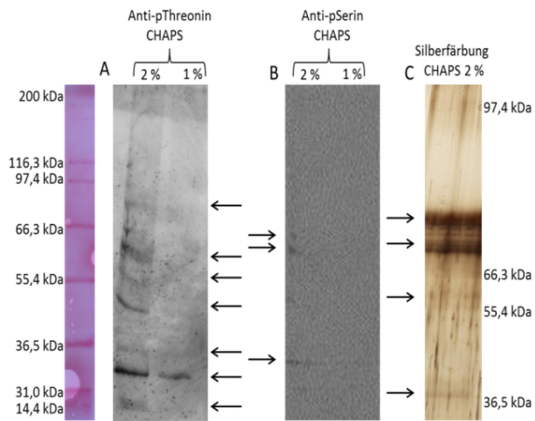


Abb. 7: Proteinausbeute mit CHAPS

HUVECs wurden mit 1 bzw. 2 % (v/v) CHAPS lysiert. Die markierten extrazellulär phosphorylierten Membranproteine wurden mithilfe von Streptavidin-Agarose-Beads aus dem Überstand isoliert und elektrophoretisch auf einem 7,5 %igen Laemmliigel aufgetrennt. *kDa* = Kilodalton

A Nachweis Phosphoproteine im Westernblot mithilfe eines Antikörpers gegen phosphoryliertes Threonin.

B Nachweis der Phosphoproteine im Westernblot mithilfe eines Antikörpers gegen phosphoryliertes Serin.

C Silberfärbung der Phosphoproteine

Abbildung 7 zeigt die phosphorylierten Proteine im Westernblot bzw. nach der Silberfärbung. Es zeigen sich erneut im Westernblot einige Banden zwischen 40 und 100 kDa, in der Silberfärbung sind Banden über 70 kDa am stärksten ausgeprägt. Insgesamt lassen sich mit einer höheren Konzentration von CHAPS (2 % (v/v)) mehr Proteine isolieren. Diese sind überwiegend an der Aminosäure Threonin phosphoryliert, wie der Einsatz eines gegen phosphoryliertes Threonin gerichteten Antikörpers (A) zeigt. Der Einsatz eines gegen phosphoryliertes Serin gerichteten Antikörpers (B) ergibt einige schwächere Banden, mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Tyrosin (nicht dargestellt) ließen sich erneut keine Proteine nachweisen. Da die Banden über 70 kDa, welche sich in der Silberfärbung zeigen, im Westernblot auch hier nicht nachzuweisen sind, muss es sich hierbei um nicht-phosphorylierte Proteine handeln.

Ergebnisse der Versuche mit Triton X-100: Triton X-100 ist ein nicht-ionisches Detergenz, welches Membranproteine durch Bildung gemischter Mizellen aus der Zellmembran löst. Das Protein wird dabei nicht denaturiert. Triton X-100 wird in der Literatur in Konzentrationen bis 1 % (w/v) zur Solubilisation von Membranproteinen aus einer Lipidmembran eingesetzt. Um die Proteinausbeute nach der Zelllyse mit Triton X-100 zu untersuchen, wurden HUVECs auf konfluent bewachsenen Petrischalen (n=2) mit biotinylierten Antikörpern gegen phosphorylierte Aminosäuren markiert (vgl. Kap. 3.1.1) und anschließend für 30 min. mit Triton X-100 0,5 % (v/v) bzw. 1 % (v/v) inkubiert (zum Vorgehen vgl. *Ergebnisse der Versuche mit n-Butanol* weiter oben). Die phosphorylierten

3 Ergebnisse

Membranproteine wurden anschließend durch Bindung an Streptavidin-Agarose-Beads aus dem Zelllysats isoliert elektrophoretisch aufgetrennt.

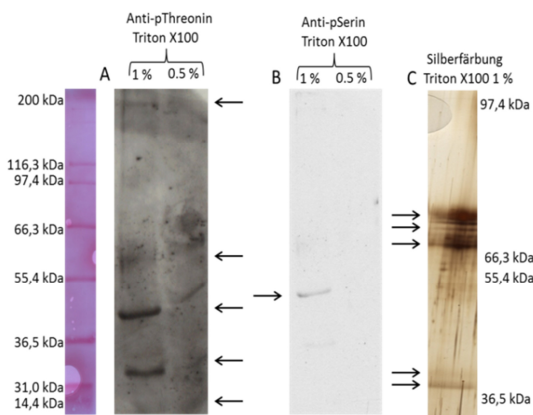


Abb. 8: Proteinausbeute mit Triton X-100

HUVECs wurden mit 0,5 bzw. 1 % (v/v) Triton X-100 lysiert. Die markierten extrazellulär phosphorylierten Membranproteine wurden mithilfe von Streptavidin-Agarose-Beads aus dem Überstand isoliert und elektrophoretisch auf einem 7,5 %igen Laemmliigel aufgetrennt. *kDa* = Kilodalton

A Nachweis der Phosphoproteine im Westernblot mithilfe eines Antikörpers gegen phosphoryliertes Threonin.

B Nachweis der Phosphoproteine im Westernblot mithilfe eines Antikörpers gegen phosphoryliertes Serin.

C Silberfärbung der Phosphoproteine

Abbildung 8 zeigt die Proteine der Eluatfraktion im Westernblot bzw. nach der Silberfärbung. Es zeigen sich erneut im Westernblot einige Banden zwischen 40 und 100 kDa, in der Silberfärbung sind Banden über 70 kDa am stärksten ausgeprägt. Insgesamt lassen sich mit einer höheren Konzentration von Triton X-100 (1 % (v/v)) mehr Proteine isolieren. Diese sind überwiegend an der Aminosäure Threonin phosphoryliert, wie der Einsatz eines gegen phosphoryliertes Threonin gerichteten Antikörpers (A) zeigt. Der Einsatz eines gegen phosphoryliertes Serin gerichteten Antikörpers (B) ergibt eine schwächere Bande, mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Tyrosin (nicht dargestellt) ließen sich erneut keine Proteine nachweisen. Da die Banden über 70 kDa, welche sich in der Silberfärbung zeigen, im Westernblot auch hier nicht nachzuweisen sind, muss es sich hierbei um nicht-phosphorylierte Proteine handeln.

Ergebnisse der Versuche mit Nonidet P40: Ähnlich wie Triton X-100 ist Nonidet P40 ein nicht-ionisches Detergenz, welches Membranproteine durch Bildung gemischter Mizellen aus der Zellmembran löst. Das Protein wird dabei nicht denaturiert. Nonidet P40 wird in der Literatur in Konzentrationen bis 1 % (w/v) zur Solubilisation von Membranproteinen aus einer Lipidmembran eingesetzt. Um die Proteinausbeute nach der Zelllyse mit Nonidet P40 zu untersuchen, wurden HUVECs auf konfluent bewachsenen Petrischalen (n=1)

3 Ergebnisse

biotinylierten Antikörpern gegen phosphorylierte Aminosäuren markiert (vgl. *Kap. 3.1.1*) und anschließend für 30 min. mit Nonidet P40 1 % (v/v) inkubiert (zum Vorgehen vgl. *Ergebnisse der Versuche mit n-Butanol* weiter oben). Die phosphorylierten Membranproteine wurden anschließend durch Bindung an Streptavidin-Agarose-Beads aus dem Zelllysate isoliert elektrophoretisch aufgetrennt.

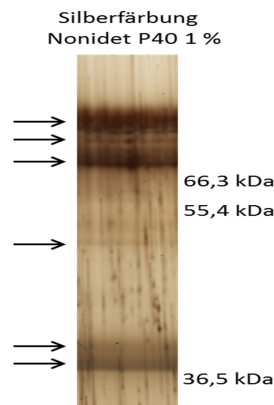


Abb. 9: Proteinausbeute mit Nonidet P40

HUVECs wurden mit 1 % (v/v) Nonidet P40 lysiert. Die markierten extrazellulär phosphorylierten Membranproteine wurden mithilfe von Streptavidin-Agarose-Beads aus dem Überstand isoliert und auf einem 7,5 %igen Laemmliigel aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend mithilfe der Silberfärbung nach Shevchenko angefärbt. *kDa* = Kilodalton

Abbildung 9 zeigt die phosphorylierten Proteine nach der Silberfärbung. Es zeigen sich auch hier Banden zwischen 40 und 100 kDa, welche im Vergleich zu den übrigen eingesetzten Detergenzien etwas stärker ausgeprägt sind und für eine höhere Proteinmenge sprechen. Die stark ausgeprägten Banden über 70 kDa entsprechen basierend auf den oben gezeigten Ergebnissen für andere Detergenzien aus dem Westernblot, in welchem diese Banden nicht nachzuweisen sind, am ehesten unspezifisch gebundenen nicht-phosphorylierten Proteinen.

Ergebnisse der Versuche mit Digitonin: Digitonin ist ein nicht-ionisches Detergenz, welches die Zellmembran erst in Konzentrationen von ca. 1 % (w/v) durch seinen Austausch gegen in der Membran enthaltenes Cholesterol solubilisiert. Um die Proteinausbeute nach der Zelllyse mit Digitonin zu untersuchen, wurden HUVECs auf konfluent bewachsenen Petrischalen (n=1) mit biotinylierten Antikörpern gegen phosphorylierte Aminosäuren markiert (vgl. *Kap. 3.1.1*) und anschließend für 30 min. mit Digitonin 1 % (v/v) inkubiert (zum Vorgehen vgl. *Ergebnisse der Versuche mit n-Butanol* weiter oben). Die phosphorylierten Membranproteine wurden anschließend durch Bindung

3 Ergebnisse

an Streptavidin-Agarose-Beads aus dem Zelllysat isoliert und nach ihrer Elution elektrophoretisch aufgetrennt.

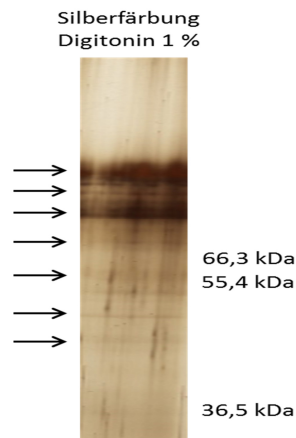


Abb. 10: Proteinausbeute mit Digitonin

HUVECs wurden mit 1 % (v/v) Digitonin lysiert. Die markierten extrazellulär phosphorylierten Membranproteine wurden mithilfe von Streptavidin-Agarose-Beads aus dem Überstand isoliert. Die Proteine wurden elektrophoretisch auf einem 7,5 %igen Laemmligel aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend mithilfe der Silberfärbung nach Shevchenko angefärbt. *kDa* = Kilodalton

Abbildung 10 zeigt die Proteine der Eluatfraktion nach der Silberfärbung. Es zeigen sich auch hier Banden zwischen 40 und 100 kDa mit im Vergleich zu den übrigen Detergenzien zusätzlichen Banden zwischen 45 und 66 kDa, was auch hier für eine etwas höhere Proteinausbeute spricht. Die stark ausgeprägten Banden über 70 kDa entsprechen basierend auf den oben gezeigten Ergebnissen für andere Detergenzien aus dem Westernblot, in welchem diese Banden nicht nachzuweisen sind, am ehesten unspezifisch gebundenen nicht-phosphorylierten Proteinen.

Ergebnisse der Versuche mit Octylglycopyranosid: Octylglycopyranosid ist ein nicht-ionisches Detergenz, welches aufgrund seiner hohen CMC (kritische Mizellenkonzentration) in Konzentrationen oberhalb von 0,7 % (w/v) zur Membransolubilisation eingesetzt wird. Um die Proteinausbeute nach der Zelllyse mit Octylglycopyranosid zu untersuchen, wurden HUVECs auf konfluent bewachsenen Petrischalen (n=1) mit biotinylierten Antikörpern gegen phosphorylierte Aminosäuren markiert (vgl. Kap. 3.1.1) und anschließend für 30 min. mit Octylglycopyranosid 1 % (v/v) inkubiert (zum Vorgehen vgl. *Ergebnisse der Versuche mit n-Butanol* weiter oben). Die phosphorylierten Membranproteine wurden anschließend durch Bindung an Streptavidin-Agarose-Beads aus dem Zelllysat isoliert und elektrophoretisch aufgetrennt.

3 Ergebnisse

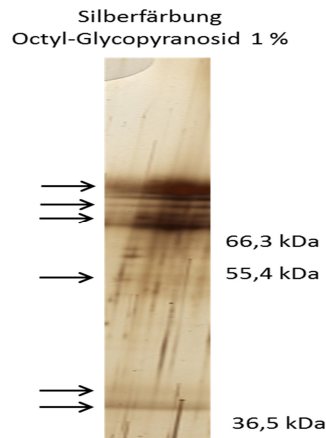


Abb. 11: Proteinausbeute mit Octyl-Glycopyranosid

HUVECs wurden mit 1 % (v/v) Octyl-Glycopyranosid lysiert. Die markierten extrazellulär phosphorylierten Membranproteine wurden mithilfe einer Streptavidinsäule aus dem Überstand isoliert und elektrophoretisch auf einem 7,5 %igen Laemmligel aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend mithilfe der Silberfärbung nach Shevchenko angefärbt. *kDa* = Kilodalton

Abbildung 11 zeigt die Proteine der Eluatfraktion nach der Silberfärbung. Es zeigen sich auch hier Banden zwischen 40 und 100 kDa mit im Vergleich zu den übrigen Detergenzien zusätzlichen Banden zwischen 45 und 66 kDa, was auch hier für eine etwas höhere Proteinausbeute spricht. Die stark ausgeprägten Banden über 70 kDa entsprechen basierend auf den oben gezeigten Ergebnissen für andere Detergenzien aus dem Westernblot, in welchem diese Banden nicht nachzuweisen sind, am ehesten unspezifisch gebundenen nicht-phosphorylierten Proteinen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Nonidet P40 1 % (v/v) anhand der Silberfärbung die beste Proteinausbeute ergibt. Da von Octyl-Glycopyranosid jedoch bekannt ist, dass es zu weniger Störungen in der Massenspektrometrie führt⁹⁵, wurde in den nachfolgenden Versuchen Octyl-Glycopyranosid in einer Konzentration von 1 % (v/v) verwendet.

3.1.3 Versuche zur Isolierung phosphorylierter Proteine aus dem Zelllysats

Die Isolierung der mit biotinkoppelten Antikörpern markierten Phosphoproteine aus dem Zelllysats erfolgte durch Bindung der Biotingruppe der Antikörper an Streptavidin. Zu diesem Zweck wurde das Zelllysats auf Streptavidin-Agarose-Beads geladen. Die Phosphoproteine wurden anschließend nach mehreren Waschschritten durch Lösen der Antigen-Antikörper-Bindung mit einem sauren Elutionspuffer (0,1 M Glycin, pH 2,5 in PBS) von den Beads eluiert (Eluatfraktion). Durch Lösen der Streptavidin-Biotin-Bindung durch einen sauren Regenerationspuffer (6 M Guanidinium-HCl, pH 2,0) sollten auch die

3 Ergebnisse

biotinylierten Antikörper von den Beads entfernt werden (Regeneratfraktion), um diese erneut verwenden zu können (s. Abb. 12).

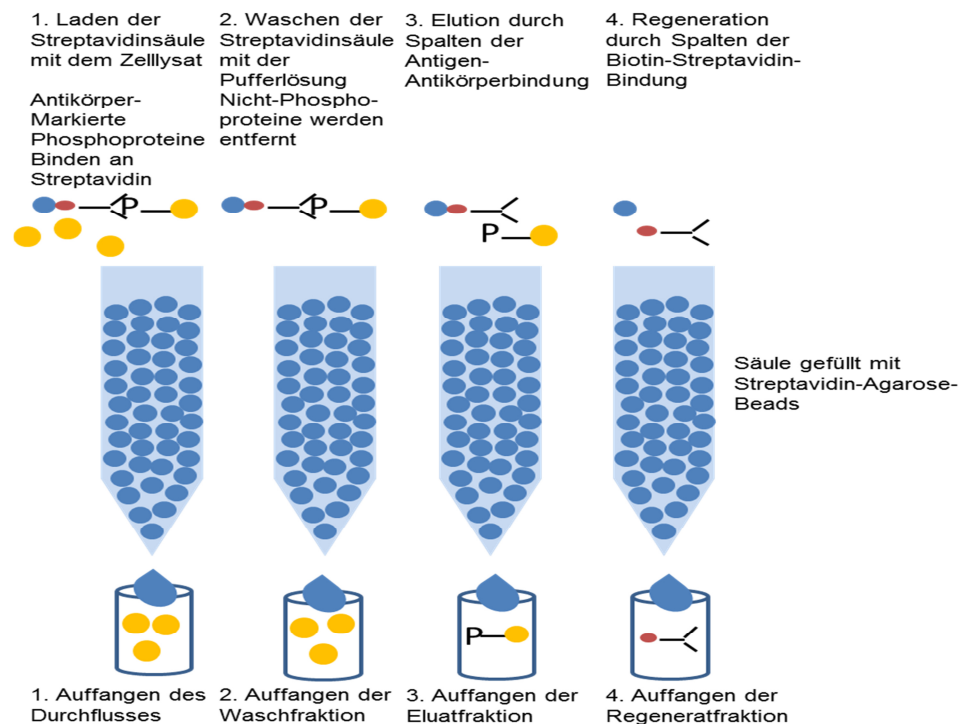


Abb. 12: Isolierung von Biotin-markierten Phosphoproteinen mithilfe der Streptavidin-Biotin-Bindung

a) Versuche zur Bindung von Biotin-markierten Phosphoproteinen an Streptavidin-Agarose-Beads:

Um zu untersuchen, ob die mit Biotin-gekoppelten Antikörpern markierten Phosphoproteine aus dem Zelllysate an Streptavidin-Agarose-Beads binden, wurden zunächst K562-Zellen in 25ml-Zellkulturflaschen (n=2) mit biotinylierten Antikörpern gegen phosphorylierte Aminosäuren markiert (vgl. Kap. 3.1.1) und anschließend in Octylglycopyranosid 1 % (v/v) lysiert (vgl. Kap. 3.1.2.). Das Zelllysate wurde anschließend auf die Streptavidin-Agarose-Beads geladen, die markierten Phosphoproteine sollten über die Biotingruppe der Antikörper an Streptavidin binden. Um dies nachzuweisen, wurden sie durch Spalten der Antigen-Antikörper-Bindung gelöst (Eluatfraktion, vgl. Abb. 12). Die biotiningekoppelten Antikörper wurden anschließend durch Spaltung der Biotin-Streptavidin-Bindung von den Streptavidin-Agarose-Beads entfernt (Regeneratfraktion, vgl. Abb. 12). Die einzelnen Fraktionen wurden auf einem 10%igen Laemmli-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Phosphoproteine durch Phosphostain sichtbar gemacht.

3 Ergebnisse

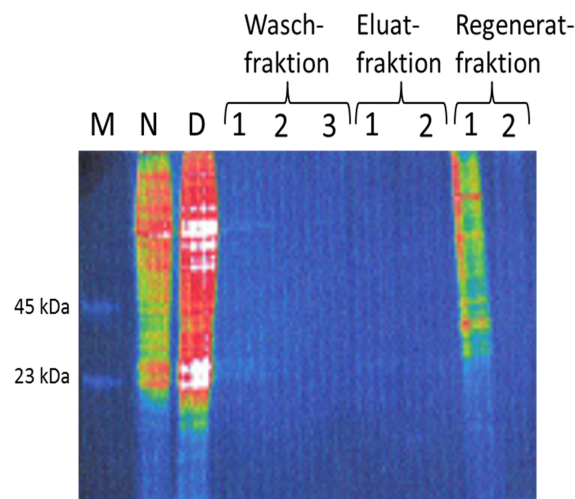


Abb. 13: Bindung Biotin-markierter Phosphoproteine an Streptavidin

M = Marker; N = Negativkontrolle (Zelllysate, nicht auf Streptavidin-Agarose-Beads geladen); D = Durchfluss; *kDa* = Kilodalton

Nach der Lyse von K562-Zellen mit 1 % Octylglycopyranosid wurde das Zelllysate auf Streptavidin-Agarose-Beads geladen. Nach Spalten der Antigen-Antikörper-Bindung bzw. der Biotin-Streptavidin-Bindung (s. Text) wurden die einzelnen Fraktionen auf einem 10%igen-Laemmli-Gel elektrophoretisch getrennt und mittels Phosphostain sichtbar gemacht.

Abbildung 13 zeigt die einzelnen Fraktionen im Phosphostain nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung. Höhere Konzentrationen von Phosphoproteinen werden durch ein rotes Farbspektrum angezeigt. Im Durchfluss findet sich die höchste Menge an Phosphoproteinen, welche sich durch den großen Anteil an nicht markierten intrazellulären Phosphoproteinen erklärt. Der Anteil an Antikörper markierten extrazellulär phosphorylierten Membranproteinen im Zelllysate ist dagegen äußerst gering. Die Waschfraktionen zeigen nur noch äußerst geringe Mengen an ungebundenen Phosphoproteinen, erkennbar an einzelnen hellen Banden. In der Eluatfraktion, in der die zuvor markierten Phosphoproteine zu erwarten wären, zeigten sich keine Banden. Dagegen zeigt sich in der Regeneratfraktion eine große Menge an Phosphoproteinen. Da die markierten Phosphoproteine aber nur einen sehr geringen Anteil am Zelllysate haben können, scheint es sich hierbei am ehesten um überwiegend unspezifisch gebundene Phosphoproteine zu handeln. Ähnliche Ergebnisse hatten schon die Versuche erbracht, in welchen sich auch in der Silberfärbung unspezifische Banden gezeigt hatten, welche im Westernblot nicht mehr nachweisbar waren (vgl. Kap.3.1.2.).

Um zu zeigen, dass die biotinkoppelten Antikörper tatsächlich an die Streptavidin-Agarose-Beads binden können, und um festzustellen, ob es zu einer unspezifischen Bindung von Proteinen an die Streptavidin-Agarose-Beads kommt, wurden anstelle des

3 Ergebnisse

Zelllysates lediglich die biotinkoppelten Antikörper gegen pSerin, pThreonin und pTyrosin sowie 1% BSA (m/v) aus der Herstellerlösung in Octylglycopyranosid 1 % (v/v) in einer Verdünnung von 1:400 auf die Streptavidin-Agarose-Beads geladen. Es wurden anschließend der Durchfluss, die Waschfraktion, die Eluatfraktion und die Regeneratfraktion sowie jeweils 6 µl der Streptavidin-Agarose-Beads elektrophoretisch aufgetrennt und nach Coomassie gefärbt.

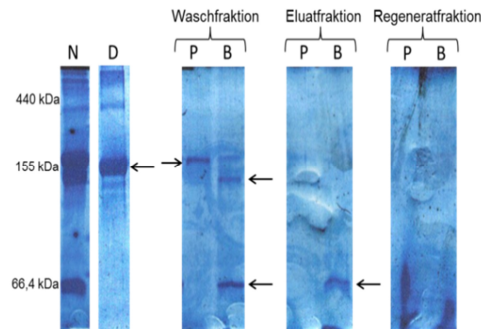


Abb. 14: Bindung biotinylierter Antikörper an Streptavidin

N = Negativkontrolle; D = Durchfluss; P = Proteine der Wasch- bzw. Eluatfraktion; B = Streptavidin-Agarose-Beads der Wasch- bzw. Eluatfraktion; *kDa* = Kilodalton

Der Pfeil markiert die an Streptavidin-Agarose-Beads gebundenen Antikörper (ca. 155 kDa) bzw. unspezifisch gebundenes BSA (66,4 kDa). Eine 1 % ige Octyl-Glycopyranosidlösung mit biotinylierten Antikörpern gegen phosphorylierte Aminosäuren sowie BSA wurde auf Streptavidin-Agarose-Beads geladen. Die Negativkontrolle zeigt lediglich die Antikörperlösung, welche nicht auf die Beads geladen wurden.

Abbildung 14 zeigt die einzelnen Fraktionen nach der Proteinfärbung nach Coomassie. In der Negativkontrolle sieht man die Banden der drei Antikörper etwas ober- und etwas unterhalb von 155 kDa, da die drei verwendeten Antikörper in ihrer Größe leicht voneinander abweichen. Der Durchfluss (D) zeigt, dass ein großer Teil der Antikörper ungebunden über die Beads läuft (Bande bei 155 kDa). In der Waschfraktion zeigt sich weiterhin ungebundener Antikörper (Waschfraktion P, Bande leicht oberhalb von 155 kDa). Der Anteil der an die Streptavidin-Agarose-Beads gebundenen Antikörper (Waschfraktion B, Bande leicht unterhalb von 155 kDa) war dagegen geringer und es hatten auch nicht alle drei Antikörper gleichmäßig an die Beads gebunden. Dagegen zeigt sich an der Bande bei 66,4 kDa unspezifisch an die Streptavidin-Agarose-Beads gebundenes BSA (Waschfraktion B). Die Eluatfraktion zeigt erwartungsgemäß keine Antikörper, da der Eluatpuffer die Biotin-Streptavidin-Bindung nicht zerstören soll. Jedoch zeigen auch die Streptavidin-Agarose-Beads keinen gebundenen Antikörper mehr (Eluatfraktion B). Die dem unspezifisch gebundenen BSA entsprechende Bande bei 66,4 kDa ist weiterhin zu sehen. In der Regeneratfraktion zeigten sich jedoch ebenfalls keine

3 Ergebnisse

Antikörper mehr, obwohl in diesem Schritt die biotinkoppelten Antikörper von den Streptavidin-Agarose-Beads entfernt werden sollten (vgl. *Abb. 12*).

Um zu testen, ob die schwache Bindung der biotinylierten Antikörper an die Streptavidin-Agarose-Beads durch die Anwesenheit des Detergenz hervorgerufen wird, wurde der Versuch wie oben beschrieben ohne Zugabe von Octyl-Glycopyranosid wiederholt. Dies ergab dieselben Ergebnisse.

Zusammenfassend zeigt sich hier also, dass erstens der Antikörper unabhängig von der Anwesenheit eines Detergenz nur sehr schwach an die Säule bindet und zweitens andere Proteine, wie z.B. das in der Probe enthaltene BSA, eine sehr starke unspezifische Bindung an die Streptavidin-Agarose-Beads aufweisen. Möglicherweise kommt es so zu einer Sättigung der Streptavidin-Agarose-Beads.

b) Versuche zur Bindung eines biotinylierten Antikörpers an Streptactin-Sepharose-Beads:

Um eine alternative Möglichkeit zur Isolierung der mit biotinylierten Antikörpern markierten phosphorylierten Membranproteine aus dem Zelllysate zu testen, wurden diesmal Streptactin-Sepharose-Beads verwendet. Diese weisen eine höhere Affinität an Biotin auf als Streptavidin. Zudem wurde anstelle der bisher verwendeten biotinylierten Antikörper gegen phosphoSerin, phosphoThreonin und phosphoTyrosin ein hochspezifischer biotinylierter Antikörper gegen phosphoTyrosin (RC 20 anti-phosphoTyrosin, Fa. BD Biosciences) verwendet. Dies sollte eine unspezifische Bindung von Antikörpern an Membranproteine ausschließen. Um zu testen, ob die Bindung von RC 20-markierten Phosphoproteinen an Streptactin-Sepharose-Beads gelingt, wurden HUVECs auf konfluent bewachsenen Petrischalen (n=3) mit RC 20 Biotin-anti-phosphoTyrosin markiert und anschließend mit Octyl-Glycopyranosid 1 % (v/v) inkubiert. Das Zelllysate wurde auf die Streptactin-Sepharose-Beads geladen. Die Elution der Proteine von den Streptactin-Sepharose-Beads erfolgte dann durch Lösen der Antigen-Antikörper-Bindung mithilfe eines sauren Elutionspuffers. Zuletzt wurden durch einen sauren Regenerationspuffer die biotinylierten Antikörper durch Lösen der Biotin-Streptactin-Bindung von den Streptactin-Sepharose-Beads entfernt (vgl. *Abb. 12 und 15*).

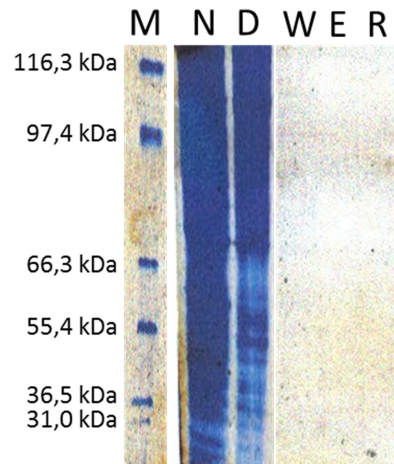


Abb. 15: Bindung von RC 20-markierten Phosphoproteinen an Streptactin

M = Marker; N = Negativkontrolle (nicht auf Streptactin-Sepharose-Beads geladen); D = Durchfluss; W = Waschfraktion; E = Eluatfraktion; R = Regeneratfraktion; *kDa* = Kilodalton

Nach der Lyse von RC 20 biotin-anti-phosphoTyrosin-markierten HUVECs mit 1 % Octylglycopyranosid wurde das Zelllysate auf Streptactin-Sepharose-Beads geladen. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend auf einem 10%igen-Laemmli-Gel elektrophoretisch getrennt und nach Coomassie gefärbt.

Abbildung 15 zeigt die einzelnen Fraktionen nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung und Proteinfärbung nach Coomassie. Im Vergleich zur Negativkontrolle, welche nicht auf die Streptactin-Sepharose-Beads aufgetragen wurde, zeigt sich im Durchfluss (D) eine fast ebenso große Menge an Protein. In der Waschfraktion, der Eluatfraktion und der Regeneratfraktion zeigten sich dagegen keinerlei Proteine mehr. Es kommt also weder zu einer Bindung von antikörpermarkierten Proteinen noch zu einer unspezifischen Bindung von Proteinen an die Streptactin-Sepharose-Beads.

3.1.4 Versuche zur massenspektrometrischen Identifikation der durch Zelllyse isolierten phosphorylierten Membranproteine

Um zu testen, ob sich in der Eluatfraktion nach oben beschriebenem Versuchsaufbau extrazellulär phosphorylierte Membranproteine befinden, wurden HUVECs auf konfluent bewachsenen Petrischalen (n=6) mit biotinylierten Antikörpern gegen phosphorylierte Aminosäuren markiert (vgl. Kap. 3.1.1) und anschließend mit Octyl-Glycopyranosid 1 % (v/v) 30 min. lang lysiert. Das Zelllysate wurde anschließend auf Streptavidin-Agarose-Beads geladen. Die Elution der phosphorylierten Proteine von den Streptavidin-Agarose-Beads erfolgte durch Lösen der Antigen-Antikörper-Bindung (vgl. Kap. 3.1.3). Die Proteine der Eluatfraktion wurden anschließend trypsinisiert und massenspektrometrisch analysiert. Diese Analyse erfolgte in einem HPLC-gekoppelten Elektrospray-Massenspektrometer. Die Datenbanksuche wurde mit dem SeQuest-Algorithmus mit den

3 Ergebnisse

in Kap. 2.5.2. angegebenen Parametern in der human International Protein Index (IPI) database (version 3.87) durchgeführt.

Es ergaben sich lediglich intrazelluläre Proteine. Extrazellulär phosphorylierte Membranproteine konnten in keinem der 6 Ansätze nachgewiesen werden.

Es lässt sich also zusammenfassend sagen, dass die hier beschriebene Methode keine zuverlässige Möglichkeit darstellt, um extrazellulär phosphorylierte Membranproteine zu isolieren und zu identifizieren. Aus diesem Grunde wurde im nächsten Teil der Arbeit eine alternative Methode eingesetzt und auf ihre Machbarkeit hin untersucht.

3.2 Methode 2: Proteolytische Abspaltung extrazellulärer Domänen von Membranproteinen

Mit dieser Methode wurden die extrazellulären Domänen sämtlicher Membranproteine proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten („shaving“). Die Isolierung von Phosphopeptiden aus dem Überstand erfolgte dann in einem zweiten Schritt durch immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC). Einen Überblick gibt *Abbildung 16*.

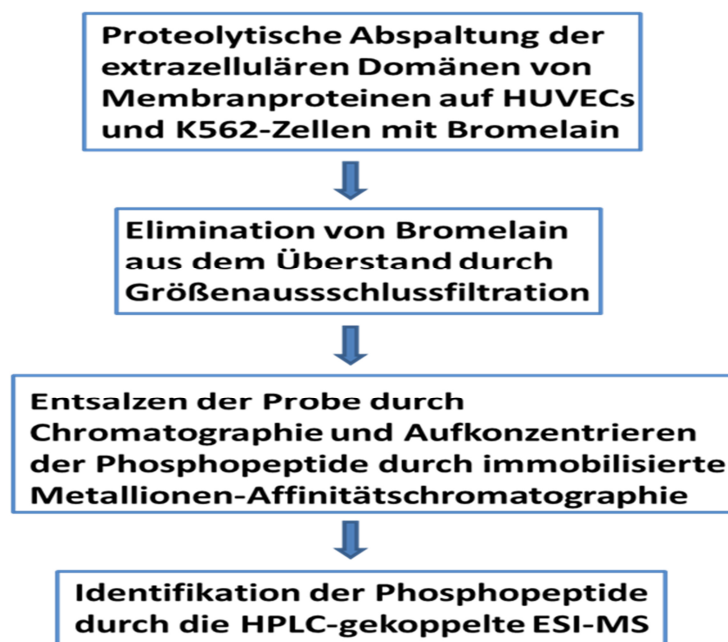


Abb. 16: Shaving von Membranpeptiden mithilfe von Proteasen

Überblick über die im Folgenden ausgeführte Methode zur proteolytischen Abspaltung von extrazellulären Domänen von Membranproteinen mit Bromelain („shaving“)

3.2.1 Versuche zum Einsatz verschiedener Proteasen

Getestet wurden Proteasen, welche in der Literatur schon zu ähnlichen Zwecken eingesetzt worden waren: Papain, Bromelain und – aus eigenen Erfahrungen in der Zellkultur und Massenspektrometrie des Instituts – Trypsin. Eine geeignete Protease sollte eine hohe Ausbeute an abgespaltenen Membranproteinen ergeben und nicht zu einer Lyse der Zellen führen, um eine Verunreinigung der Proben mit intrazellulären Proteinen zu vermeiden.

Ergebnisse der Versuche mit Trypsin: Trypsin ist eine Serinprotease mit einem Molekulargewicht von 23,5 kDa. Zunächst wurde das in unserer Zellkultur verwendete Trypsin der Fa. Sigma (T4049) auf seine Eignung zur proteolytischen Abspaltung von Membranproteinen getestet (Protokoll modifiziert nach Liu et al.⁹³). Aus einer Studie von Brown et al.⁹⁷ war bekannt, dass Oberflächenproteine oberhalb der Konzentration von 0,025% Trypsin abgespalten werden. Um die Proteinausbeute und das Überleben der Zellen während der Proteolyse zu untersuchen, wurden HUVECs auf konfluent bewachsenen Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm (jeweils n=2) 60 und 120 min. im Brutschrank in der unverdünnten Enzymlösung (0,25 % m/v) sowie in 0,05 % m/v Trypsin in HBSS inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines Proteaseinhibitors gestoppt. Die Überstände wurden elektrophoretisch auf 17,5 %igen Schägger-Gelen aufgetrennt und nach Coomassie sowie mit einer Silberfärbung nach Shevchenko gefärbt. Auf diese Weise konnten jedoch lediglich Trypsin und keine abgespaltenen Peptide dargestellt werden.

Um zu untersuchen, ob es während der Inkubationszeit zu einem Selbstverdau von Trypsin gekommen war oder die entstandenen Peptide zu klein für den Nachweis auf einem Gel waren, wurden in einem zweiten Versuch die Überstände aus dem Verdau mithilfe eines HPLC-gekoppelten ESI-MS analysiert. Hier stellte sich heraus, dass die Proben trotz der vorgeschalteten HPLC zu salzhaltig waren (enthält 180 µg S-EDTA/ml), um ein stabiles Elektrospray zu erhalten. Auch die Kapazität der in einem weiteren Versuch eingesetzten ZipTip-Kapillaren zum Entsalzen der Proben mithilfe der Festphasenchromatographie reichte dazu nicht aus. Aus diesem Grunde wurde die Festphasenchromatographie durch die Dialyse ersetzt. Die Überstände aus dem Verdau wurden nach oben beschriebenem Versuchsaufbau zunächst für 2 x 2 h gegen 800 ml H₂O dialysiert. Hierbei zeigte sich weiterhin ein instabiles Elektrospray. Ähnliche Ergebnisse brachte auch die Erhöhung der Dialysezeiten zunächst auf 2 x 4h und 4 x 2h. Erst bei einer Dialysezeit über Nacht konnte eine für ein stabiles Elektrospray ausreichend niedrige

3 Ergebnisse

Salzkonzentration erreicht werden. Dabei kam es jedoch auch zu einem Verlust der abgedauten Peptide, so dass nur noch kleine Mengen von Trypsin in den Proben massenspektrometrisch nachweisbar waren.

Um eine niedrigere Salzkonzentration in den Proben zu erreichen, wurde der Versuch mit lyophilisiertem und hoch aufgereinigtem Trypsin der Fa. Sigma (T9935) wiederholt, welches in unserem Institut für eine Trypsinisierung von Proteinen vor der MS-Analyse eingesetzt wurde. Dieses wurde in den Konzentrationen 0,15 % m/v, 0,1 % m/v, 0,005 % m/v, 0,001 % m/v, 0,00075 % m/v und 0,0005 % m/v in PBS getestet. Erneut wurden HUVECs auf konfluent bewachsenen Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm (jeweils n=2) in der Enzymlösung inkubiert. Bereits nach wenigen Minuten kam es bei den höheren Trypsin-Konzentrationen (0,01 - 0,001 % m/v) zu einer Zelllyse. Bei einer Trypsin-Konzentration von 0,0005 % m/v zeigte sich zwar lichtmikroskopisch eine nur geringe Anzahl lysierter Zellen, es konnten massenspektrometrisch anschließend jedoch lediglich Trypsin und ein großer Überschuss intrazellulärer Proteine nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigten die Versuche mit Trypsin, dass erstens das in der Zellkultur eingesetzte Trypsin entweder nicht zu einem Abbau von Oberflächenproteinen führte oder der aufgrund der salzhaltigen Pufferlösung notwendige Entsalzungsschritt zu einem Peptidverlust führte. Zweitens lysierte das hochaufgereinigte und lyophilisierte Trypsin die Zellen auch in niedrigen Konzentrationen. Insgesamt zeigte sich Trypsin nicht geeignet für die proteolytische Abspaltung von Membranproteinen.

Ergebnisse der Versuche mit Papain: Papain ist eine Cysteinprotease mit einem Molekulargewicht von ca. 23 kDa, welche in der Literatur für die Isolation von einzelnen lebenden Zellen aus einem Gewebsverband verwendet wird^{92,98}. Nach der Methode von Huettner et al.⁹² wurden $1,5 \times 10^6$ K562-Zellen in 1 ml Eppendorf-Tubes bzw. $0,5 \times 10^6$ HUVECs auf 6-Well-Platten (n=2) in 0,17% m/v Papain (Fa. Fluka) inkubiert. Da keine Gewebeverbände, sondern einzelne Zellen eingesetzt wurden, wurde damit eine 10fach niedrigere Konzentration als in der Literatur angegeben gewählt, um eine Zelllyse zu vermeiden. Die Zellen wurden für jeweils 15, 30, 45, 60, 75 und 90 min in der Enzymlösung bei einem pH von 7,0 inkubiert. Dieser entspricht dem pH-Optimum von Papain. In der Literatur konnten nach 90minütiger Inkubation von Gewebsverbänden in Papain 90% lebende Zellen isoliert werden⁹², so dass 90 min. Inkubation von uns als Obergrenze gewählt wurde. Nach den o. gen. Zeiträumen wurde die Proteolyse durch Zugabe von Proteaseinhibitoren gestoppt und das Überleben der Zellen untersucht.

3 Ergebnisse

K562-Zellen: Das Überleben der K562-Zellen wurde lichtmikroskopisch mithilfe der Trypanblau-Färbung bestimmt. Diesbezüglich konnte als Ergebnis festgehalten werden, dass es nach einer Inkubation mit Papain für 15 min. zu durchschnittlich 31,5% toten Zellen, nach 60 min. sogar zu einem Absterben von 39 % der Zellen kommt.

HUVECs: Das Überleben der Zellen wurde ebenfalls lichtmikroskopisch untersucht. Die Zellen wurden auf Formveränderungen und die Lösung vom Untergrund hin untersucht. Hier kam es zu einer zunehmenden Anzahl von Zellen mit Stechapfelform bis zu einer Inkubationszeit von 45 min, danach konnte keine weitere Formveränderung mehr beobachtet werden. In der Trypanblaufärbung der Zellen nach 90 min. zeigte sich ein Durchschnitt von 6,6 % toten Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es bei K562-Zellen bereits nach einer Inkubationszeit von 15 min. zu einem großen Anteil toter Zellen kommt, während adhäsive Zellen wie HUVECs ein besseres Überleben zeigen.

Zudem wurde auch die Menge der abgedauten Oberflächenproteine von K562-Zellen und HUVECs nach 90 min. Inkubationszeit bestimmt. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge Zellen ohne Zugabe von Papain bei pH 7,0 ebenfalls 90 min inkubiert. Der Überstand wurde zunächst zum Nachweis größerer Peptide auf einem 12,5%igen Laemmli-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

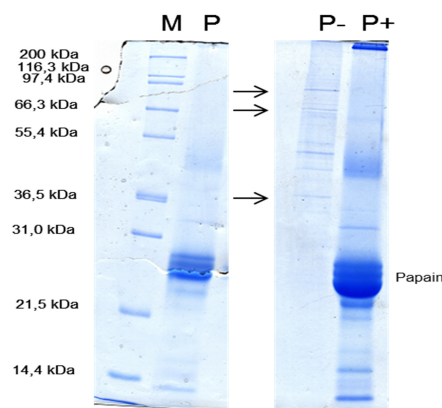


Abb. 17: Peptidausbeute mit Papain

M = Molekulargewichtsmarker; P = Papain in Papainpuffer; P- = Überstand der Kontrolle ohne Papain; P+ = Überstand des Ansatzes mit Papain; *kDa* = Kilodalton

Die Pfeile markieren Peptide im Überstand der Kontrolle, welche sich im Papainansatz nicht finden. K562-Zellen wurden jeweils 90 min ohne Papain bzw. in einem Puffer mit 20 U/ml Papain inkubiert. Nachher wurde der Überstand auf einem 12,5 %igen Laemmli-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und nach Coomassie gefärbt.

3 Ergebnisse

Abbildung 17 zeigt den Überstand aus dem Verdau von K562-Zellen mit einer Konzentration von 20 U/l Papain auf einem 12,5%igen Laemmli-Gel. Es wurden Papain (P), der Überstand der Kontrolle ohne den Zusatz von Papain (P-), sowie der Überstand des Ansatzes mit Papain (P+) nach 90 minütiger Inkubation elektrophoretisch aufgetrennt und nach Coomassie gefärbt. Im Vergleich zu Papain (P) zeigen sich nach 90 minütiger Proteolyse (P+) keine weiteren Banden, welche enzymatisch abgedauten Oberflächenproteinen entsprechen könnten. Daneben zeigen sich im Überstand des Kontrollansatzes (P-) Banden, welche sich in den Papainansätzen nicht wiederfinden. Da Papain ein pH-Optimum im sauren Bereich bei pH 7,0 hat, könnte es sich bei diesen Banden um intrazelluläre Proteine handeln, die durch eine pH-bedingte Zelllyse in den Überstand gelangt sind. Das verwendete Papain wird aus dem Latexsaft der Papaya gewonnen und enthält Verunreinigungen. Diesen entsprachen wahrscheinlich die in den beiden Papain-Ansätzen sichtbaren zusätzlichen Banden ober- und unterhalb von 23 kDa (dem in der Literatur angegebenen Molekulargewicht von reinem Papain). Proteolytisch abgespaltene Peptide von der Zelloberfläche konnten nicht nachgewiesen werden.

Um Peptide in einem kleineren Massenbereich darstellen zu können, wurde erneut wie oben beschrieben verfahren und der Überstand nun auf ein 16,5%iges Schäggergel, welches einen Massenbereich von 5-70 kDa abdeckt, aufgetragen:

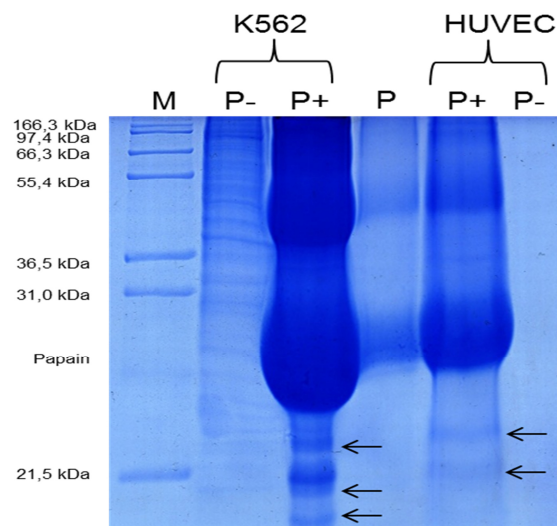


Abb. 18: Peptidausbeute mit Papain

M = Molekulargewichtsmarker; P = Papain in Papainpuffer; P- = Überstand der Kontrolle ohne Papain; P+ = Überstand des Ansatzes mit Papain; *kDa* = Kilodalton

Die Pfeile markieren Peptide im Überstand der Papainansätze, welche sich in Papain alleine nicht finden. K562-Zellen und HUVECs wurden jeweils 90 min ohne Papain bzw. in einem Puffer mit 20 U/ml Papain inkubiert. Nachher wurde der Überstand auf einem 17,5 %igen Schägger-Minigel elektrophoretisch aufgetrennt und nach Coomassie gefärbt.

3 Ergebnisse

Abbildung 18 zeigt den Überstand aus einem Verdau von K562-Zellen und HUVECs mit 20 U/l Papain auf einem 17,5%iges Schagger-Gel. Es wurden Papain (P), der Überstand der Kontrollen ohne den Zusatz von Papain (P-), sowie der Überstand der Ansätze nach 90 minütiger Proteolyse mit Papain (P+) elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Es zeigten sich nach dem Verdau bei beiden Zellarten zusätzliche Banden in einem Massenbereich von unter 23 kDa, welche bei Papain nicht vorkommen. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass die aufgetragene Menge an reinem Papain niedriger war als die, welche für den Verdau verwendet wurde. Die Kontrollen, in denen K562-Zellen jeweils nur dem sauren Puffermedium ohne darin enthaltenes Papain ausgesetzt wurden (P-), zeigten erneut Banden, welche bei dem Verdau nicht auftreten. Diese wurden als Hinweis auf eine Zelllyse gewertet. Ähnliche Banden fanden sich in der Kontrolle mit HUVECs nicht.

Zusammenfassend zeigte sich also bei dem Verdau mit Papain bereits nach 15 min lichtmikroskopisch eine Lyse von bis zu 35% der Zellen. Außerdem zeigte die Gelelektrophorese, dass es durch den benötigten pH-Wert von 7,0 zu einer Zelllyse kommt. Da beides zu einem hohen Überschuss intrazellulärer Proteine in der Probe führen musste, zeigte sich Papain für den proteolytisch Abbau von Membranproteinen nicht geeignet.

Ergebnisse der Versuche mit Bromelain: Bromelain aus dem Stamm der Ananas ist ein Proteasengemisch mit einem Molekulargewicht von 18,5 – 31,5 kDa. Bromelain wurde bereits zum Abbau von Oberflächenproteinen auf T-Lymphozyten in der Literatur angewendet. Entsprechend der Methode von Munzig et al. wurden K562-Zellen und HUVECs (n=2) in Bromelain für 45 min inkubiert⁹¹. Laut der Literatur hatten 0,0075 % m/v aufgereinigtes Bromelain zu einem Abbau von Oberflächenproteinen geführt⁹¹. In dieser Arbeit konnten lediglich bei einer Konzentration von 0,1 % m/v Bromelain elektrophoretisch Peptide im Überstand nachgewiesen werden. Um die optimale Dauer des Verdaus mit 0,1 % m/v Bromelain herauszufinden, wurden anschließend jeweils ca. 1×10^6 Zellen K562-Zellen in 1 ml-Eppendorf-Tubes (n=2) bzw. HUVECs pro Feld auf einer 6-Well-Platte (n=2) für jeweils 15, 30, 45 und 60 min in 0,1 % m/v Bromelain inkubiert. In der Literatur konnte nach 60minütiger Inkubation von T-Lymphozyten ein Abbau von Oberflächenproteinen ohne erhöhte Zelllyse nachgewiesen werden⁹¹, so dass dies von uns als Obergrenze gewählt wurde. Nach den o. gen. Zeiträumen wurde zunächst das Überleben der Zellen untersucht.

3 Ergebnisse

K562-Zellen: Erneut wurde das Überleben der K562-Zellen wurde lichtmikroskopisch mithilfe der Trypanblau-Färbung bestimmt. Nach 15 min. zeigten sich 17,5 % tote Zellen, während nach 60 min. Inkubationszeit keine abgestorbenen Zellen mehr nachweisbar waren.

HUVECs: Das Überleben der Zellen wurde ebenfalls lichtmikroskopisch untersucht. Die Zellen wurden lichtmikroskopisch auf Formveränderungen und die Lösung vom Untergrund hin untersucht. Bis zu einer Inkubationszeit von 30 Minuten kam es zum vereinzelt Auftreten von Zellen in Stechapfelform. In der Trypanblaufärbung ergaben sich nach 60 min. Inkubationszeit 2,7 % tote Zellen.

Im Vergleich zu dem Verdau mit Papain kam es somit sowohl bei K562-Zellen (Papain 39% tote Zellen nach 60 min., Bromelain 0% tote Zellen nach 60 min.) als auch bei HUVECs (Papain 6,6% tote Zellen nach 60 min., Bromelain 2,7% tote Zellen nach 60. Min.) zu einer deutlich geringeren Anzahl abgestorbener Zellen.

Zudem wurde die Menge an abgedauten Peptiden nach einem 60minütigen Verdau mit 0,1 % m/v Bromelain untersucht. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge Zellen in PBS ohne Zugabe von Bromelain ebenfalls 60 min. inkubiert. Der Überstand wurde zunächst auf einem 12,5%igen Laemmli-Gel elektrophoretisch aufgetrennt

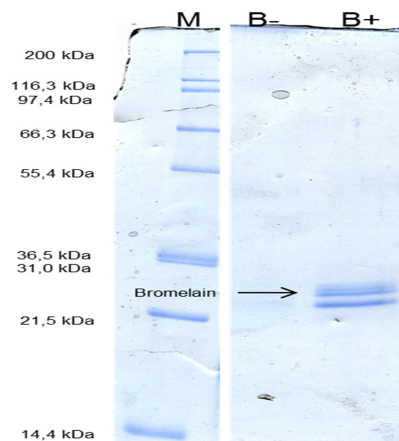


Abb. 19: Peptidausbeute mit Bromelain - hochmolekular

M = Molekulargewichtsmarker; B- = Überstand der Kontrolle ohne Bromelain; B+ = Überstand des Ansatzes mit Bromelain; *kDa* = Kilodalton

K562-Zellen wurden jeweils 60 min in PBS ohne Bromelain bzw. in PBS mit 1 mg/ml Bromelain inkubiert. Nachher wurde der Überstand auf einem 12,5 %igen Laemmli-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und nach Coomassie gefärbt.

Abbildung 19 zeigt ein 12,5%iges Laemmli-Gel. Es wurden der Überstand der Kontrollen ohne den Zusatz von Bromelain (B-) sowie der Überstand des Ansatzes nach 60minütigem

3 Ergebnisse

Verdau mit Bromelain (B+) elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Im Vergleich zu der Kontrolle (B-) zeigen sich nach 60minütigem Verdau mit Bromelain (B+) lediglich Banden, welche Bromelain entsprechen. Abgedaute Peptide finden sich hier nicht. Da das Laemmli-Gel nur einen Massenbereich bis zu 14,4 kDa abbildet, sollten nun Peptide in einem kleineren Massenbereich dargestellt werden. Zu diesem Zweck wurde erneut wie oben beschrieben verfahren und der Überstand nun auf ein 16,5%iges Schäggergel, welches einen Massenbereich von 5-70 kDa abdeckt, aufgetragen.

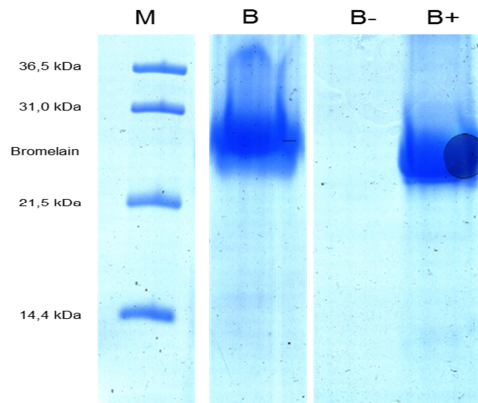


Abb. 20: Peptidausbeute mit Bromelain - niedermolekular

M = Molekulargewichtsmarker; B = Bromelain in PBS; B- = Überstand der Kontrolle ohne Bromelain; B+ = Überstand des Ansatzes mit Bromelain; *kDa* = Kilodalton

HUVECs wurden jeweils 60 min in PBS ohne Bromelain bzw. in PBS mit 1 mg/ml Bromelain inkubiert. Nachher der Überstand auf einem 17,5 %igen Schägger-Minigel elektrophoretisch aufgetrennt und nach Coomassie gefärbt.

Abbildung 20 zeigt ein 16,5%iges Schägger-Gel. Es wurden PBS mit Bromelain (B), der Überstand der Kontrollen ohne den Zusatz von Bromelain (B-), sowie der Überstand nach 60minütigem Verdau mit Bromelain (B+) elektrophoretisch aufgetrennt und nach Coomassie gefärbt. Wie bereits das Laemmli-Gel zeigt auch der kleinere Massenbereich des Schäggergels keine anderen Banden als die der in Bromelain enthaltenen Proteasen. Die anschließende massenspektrometrische Analyse der Überstände ergab neben einem großen Überschuss an Bromelain auch einige durch Bromelain abgespaltene Oberflächenpeptide. Diese besaßen eine Masse zwischen 1,8 und 2,9 kDa und wurden daher in der Gelelektrophorese nicht erfasst.

Zusammenfassend zeigten diese Versuche also, dass ein Verdau von HUVECs und K562-Zellen über 60 min mit einer Konzentration von 0,1 % m/v Bromelain erstens zu einer massenspektrometrisch nachweisbaren Peptidausbeute führt. Zweitens ergab sich, dass es dabei zwar nicht zu einem nennenswerten Überschuss von intrazellulären Proteinen aber zu einem deutlichen Überschuss von Bromelain kommt.

3.2.2 Versuche zur Elimination von Bromelain aus dem Überstand durch Größenausschlussfiltration

In einem weiteren Schritt sollte Bromelain aus dem Überstand entfernt werden. Auf diese Weise sollte einerseits verhindert werden, dass die von der Zelloberfläche abgedauten Peptide weiter gespalten werden und dann aufgrund zu kurzer Aminosäuresequenzen nicht mehr identifizierbar sind. Andererseits sollte ein Überschuss von Bromelain in der Probe vermieden werden, der zu einer geringeren Nachweisbarkeit der in nur geringer Menge vorliegenden Phosphopeptide führt. Zu diesem Zweck wurde die Größenausschlussfiltration eingesetzt. Dies wurde durch ein Zentrifugenröhrchen mit eingesetztem Filter erreicht (Microcon YM-10 der Fa. Sigma). Da Bromelain ein Proteasengemisch mit Molekulargewichten von 18,5 – 31,5 kDa ist, während die von uns massenspektrometrisch nachgewiesenen Peptide aus dem Überstand ein Molekulargewicht von 1,8 – 2,9 kDa hatten, entschieden wir uns für eine Porengröße von 10 kDa. Eine Filtergröße von 10 kDa würde also Bromelain, nicht aber die abgespaltenen Peptide, aus der Probe eliminieren. Um zu zeigen, dass Bromelain tatsächlich vollständig durch die Größenausschlussfiltration aus der Probe eliminiert werden kann, wurden $1,5 \times 10^6$ HUVECs auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm (n=2) für 60 min in 0,1 % m/v Bromelain in PBS inkubiert. Der Überstand wurde anschließend wie vom Hersteller empfohlen jeweils 1 min. bei $13.800 \times g$ in den Microcon-Zentrifugenröhrchen filtriert. Das Filtrat sowie das Pellet wurden anschließend auf einem 12,5%igen Laemmli-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

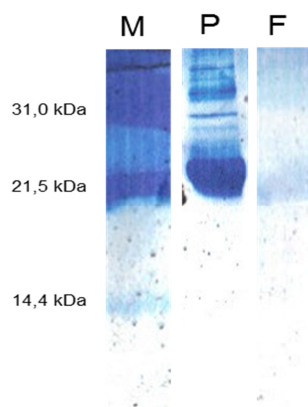


Abb. 21: Elimination von Bromelain aus der Probe

M = Molekulargewichtsmarker; P = Pellet nach Größenausschlussfiltration; F = Filtrat nach Größenausschlussfiltration; *kDa* = Kilodalton

HUVECs wurden 60 min. in PBS mit 1 mg/ml Bromelain inkubiert. Anschließend erfolgte die Größenausschlussfiltration des Überstandes mithilfe der Microcon-Zentrifugenröhrchen. Das Pellet sowie das Filtrat wurden anschließend auf einem 12,5%igen Laemmli-Gel elektrophoretisch getrennt und nach Coomassie gefärbt.

3 Ergebnisse

Abbildung 21 zeigt das nach Coomassie gefärbte Laemmli-Gel. Während sich im Pellet in einem Massenbereich zwischen 21 und 31 kDa die Bromelain entsprechenden Banden finden, zeigen sich im Filtrat keinerlei Proteine. Bromelain ist somit erfolgreich durch die Größenausschlussfiltration aus der Probe entfernt worden. Die abgespaltenen Peptide konnten auf dem Gel aufgrund ihrer Größe elektrophoretisch nicht nachgewiesen werden.

3.2.3 Ergebnisse der proteolytischen Abspaltung extrazellulär phosphorylierter Membranproteine auf HUVECs und K562-Zellen mithilfe von Bromelain

In der hier vorgestellten Methode wurden extrazellulär phosphorylierte Domänen von Membranproteinen auf der Oberfläche von HUVECs und K562-Zellen proteolytisch abgespalten und massenspektrometrisch identifiziert (vgl. *Abb. 16*). Nachdem sich Bromelain in den Vorversuchen als am besten geeignet gezeigt hatte, wurden jeweils ca. $1,5 \times 10^6$ HUVECs auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm bzw. $1,0 \times 10^6$ K562-Zellen auf 6-Well-Platten ($n=4$) 60 min. in 0,1 % (m/v) Bromelain inkubiert. Nach dem Verdau konnte Bromelain durch die Größenausschlussfiltration aus dem Überstand eliminiert werden. Die Proben enthielten nun die proteolytisch abgespaltenen extrazellulären Domänen der Membranproteine. Diese Peptide wurden mithilfe der Elektrospray-Ionisation massenspektrometrisch identifiziert. Um ein stabiles Elektrospray zu erreichen, wurden die Proben zunächst mithilfe der Festphasenchromatographie (ZipTip_{C18}-Pipettenspitzen der Fa. Millipore) entsalzt und konzentriert. Hier wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Aus der Gesamtheit der zuvor proteolytisch abgespaltenen Membranpeptide sollten die Phosphopeptide aufkonzentriert werden. Dies geschah mithilfe der immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC). Für diese Aufreinigung der Phosphopeptide in der Probe wurde nach einem Protokoll basierend auf den Vorversuchen zur Aufreinigung von Phosphopeptiden von Fr. Dr. Simon-Buss aus unserem Institut verfahren. Die Analyse der so aufgereinigten Phosphopeptide erfolgte in einem HPLC-gekoppelten Elektrospray-Massenspektrometer. Das weitere Vorgehen basierte auf Vorversuchen mit der massenspektrometrischen Analyse von Phosphopeptiden von Fr. Dr. Simon-Buss aus unserem Institut. Zunächst wurden die an eine Vorsäule gebundenen Peptide während der HPLC bei einer Flussrate von 20 μ l/min über 20 min. entsalzt. Auf der an das Massenspektrometer gekoppelten selbst hergestellten Trennsäule wurden die Peptide anschließend durch einen 80-minütigen ansteigenden Acetonitril-Gradienten fraktioniert eluiert. Durch eine an der Spitze dieser

3 Ergebnisse

Trennsäule angelegte Spannung von 2,4 kV wurde die Eluatfraktion direkt in ein Elektrospray umgewandelt und die eluierten Peptide massenspektrometrisch analysiert. Die anschließende Datenbanksuche wurde mit dem SeQuest-Algorithmus mit den folgenden Parametern in der Datenbank human International Protein Index (IPI) database (version 3.87) durchgeführt. Es wurden dabei die folgenden Suchparameter verwendet:

DeltaCN	> 0,1
XCorr	1,0
XCorr vs. Charge state	1,50; 2,00; 2,50 bzw. 3,00 für 1-, 2-, 3- bzw. 4-fach geladene Ionen
Number of top matches	2
Peptide probability	0,05
Peptide tolerance	2,0
Fragment ions tolerance	1,0
Missed cleavage sites	2

Zudem wurden folgende mögliche Modifikationen angegeben:

+ 79.966311	für eine Phosphorylierung an Serin, Threonin oder Tyrosin
+ 57.021464	für eine Carboxyamidomethylierung an Cystein
+ 15.994920	für eine Oxidation an Methionin

Ob die von uns gefundenen Phosphorylierungsstellen bereits bekannt sind, wurde mit den Datenbanken www.phosphosite.org sowie www.uniprot.org ermittelt. Die im Folgenden aufgeführten extrazellulär phosphorylierten Transmembranproteine und sezernierten Proteine konnten nach einem Verdau mit Bromelain auf HUVECs und K562-Zellen identifiziert werden.

3 Ergebnisse

a) HUVECs mit Bromelain

In *Tab. 2* sind die auf HUVECs nach proteolytischer Abspaltung der extrazellulären Domänen von Membranproteinen mit Bromelain mit dem SeQuest-Algorithmus ermittelten Peptide und dazugehörigen Proteine aufgeführt.

Tabelle 2: Identifizierte Peptide und dazugehörige Proteine aus dem Überstand von HUVECs nach dem Zusatz von Bromelain						
Entsprechend der Datenbank human International Protein Index (IPI) database (version 3.87)						
Peptidsequenz	Sp	RSp	XCorr	ΔCN	Ions Cov.	Extrazelluläre Phosphorylierung bekannt
NOTCH1 (P46531)						
CVDSY*TCTCPAGFSGI (= AA 963-978)	687,6	11	2,682	0,120	27/90	NEIN
Protein tyrosine phosphatase receptor type D isoform 3 (P23468)						
EMVKEIS*IPEEVPTG (= AA 906-920)	500,7	105	2,905	0,155	31/120	NEIN
Otopetrin 1 (Q7RTM1)						
LITLGFGNITTVLDDHT*P (=AA234-251)	439,2	104	2,628	0,183	30/108	NEIN
Regulator of G-Protein signalling 13 (O14921)						
SY*PRFLKSEMYQK (=AA 136-148)	592,3	4	3,018	0,121	18/36	NEIN
<i>Sp</i> Preliminary Score <i>RSp</i> Ranking Preliminary Score <i>XCorr</i> Cross Correlation Score <i>ΔCN</i> Delta Correlation Value <i>Ions Cov.</i> Ions Coverage. Erläuterungen zu den SeQuest-Parametern s. <i>Kap. 2.5.2.2.</i> * = Phosphorylierung T,S,Y. Die Angabe, ob die gefundene Phosphorylierungsstelle bekannt ist oder nicht, wurde über die Datenbank www.phosphosite.org ermittelt.						

Massenspektren der aufgeführten Peptide:

Die in den Massenspektren abgebildeten Aminosäuren aus den gefundenen Peptiden sind im Folgenden in der Aminosäuresequenz farblich markiert:

- = nur b-Ion(en) im Spektrum gefunden
- = nur y-Ion(en) im Spektrum gefunden
- = sowohl b- als auch y-Ion(en) im Spektrum gefunden
- * = Phosphorylierungsstelle

Die *Abb. 22 – 25* zeigen die Massenspektren und Aminosäuresequenzen der auf HUVECs identifizierten Peptide.

3 Ergebnisse

Notch 1

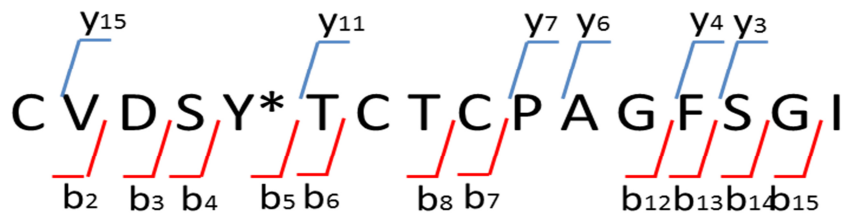
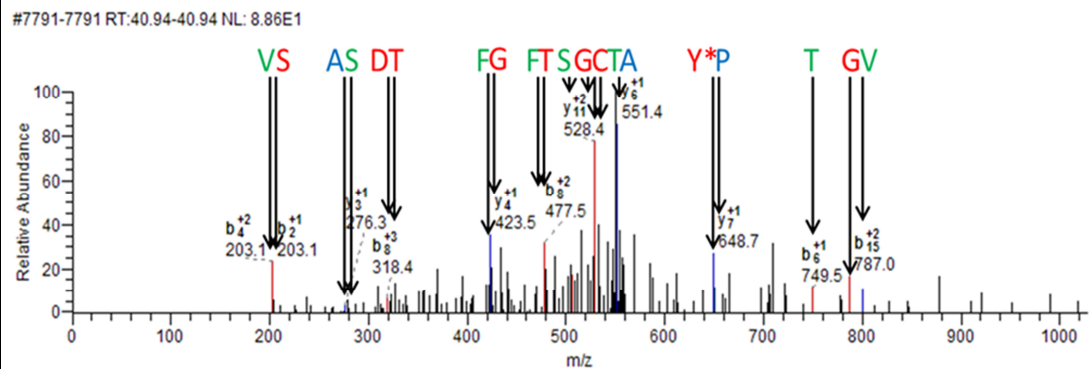


Abb. 22: SeQuest-Spektrum des Peptides **CVDSY*TCTCPAGFSGI**

Anhand der b-Ionenserie konnte das Peptid identifiziert werden (RSp 11). * = Phosphorylierungsstelle

Otopetrin 1:

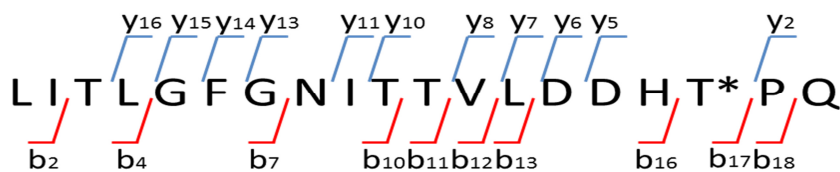
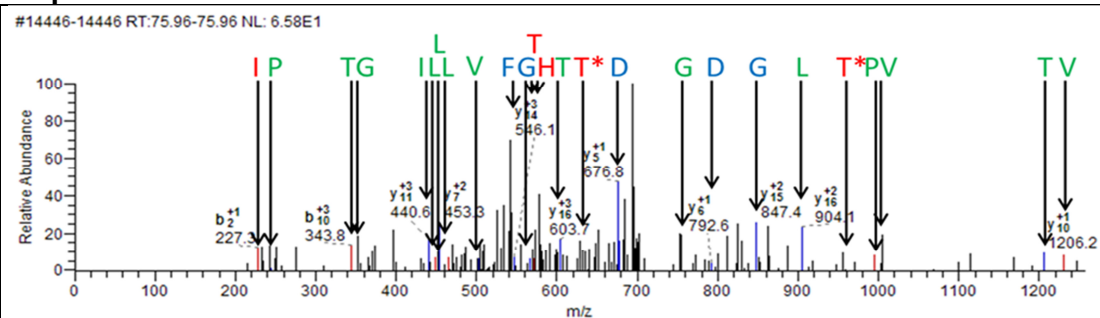
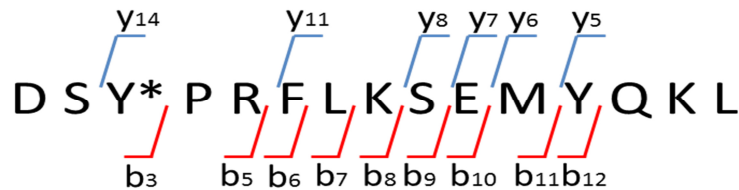
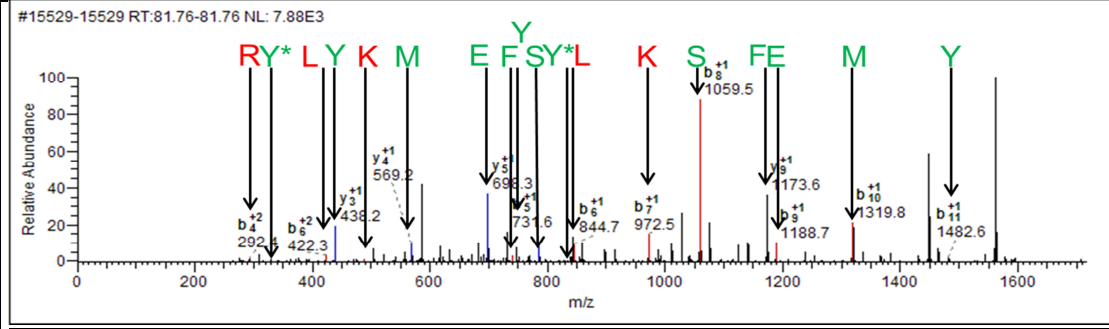


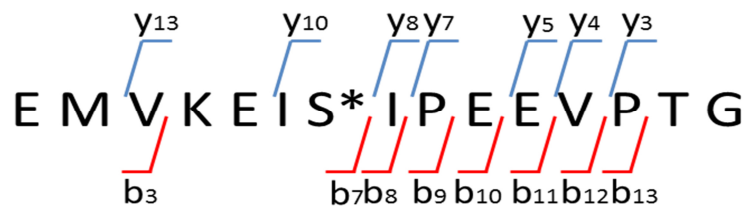
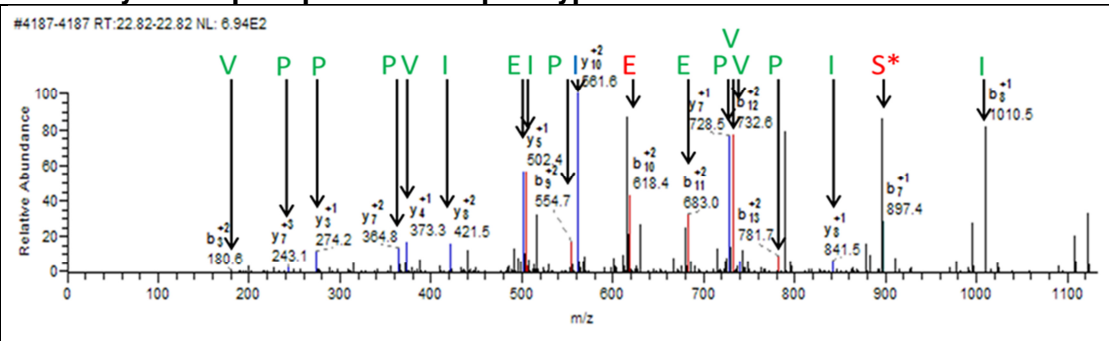
Abb. 23: SeQuest-Spektrum des Peptides **LITLGFGNITTVLDDHT*PQ**

Anhand der b- und y-Ionenserie konnte das Peptid eindeutig identifiziert werden (RSp 104).

* = Phosphorylierungsstelle

Regulator of G-protein signalling 13:**Abb. 24: SeQuest-Spektrum des Peptides DSY*PRFLKSEMYQKL**

Anhand der b-Ionenserie konnte das Peptid identifiziert werden (RSp 4). * = Phosphorylierungsstelle

Protein tyrosine phosphatase receptor type D isoform 3:**Abb. 25: SeQuest-Spektrum des Peptides EMVKEIS*IPPEVPTG.**

Anhand der b- und y-Ionenserie konnte das Peptid identifiziert werden (RSp 105). * = Phosphorylierungsstelle

b) HUVECs ohne Bromelain

In der Negativkontrolle, d.h. dem Ansatz ohne proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domänen von Membranproteinen, konnten auf HUVECs keine Phosphopeptide massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

c) K562-Zellen mit Bromelain

In *Tab. 3* ist das auf K562-Zellen nach proteolytischer Abspaltung der extrazellulären Domänen der Membranproteine mit Bromelain mit dem SeQuest-Algorithmus ermittelte Peptid und dazugehörigen Proteine aufgeführt.

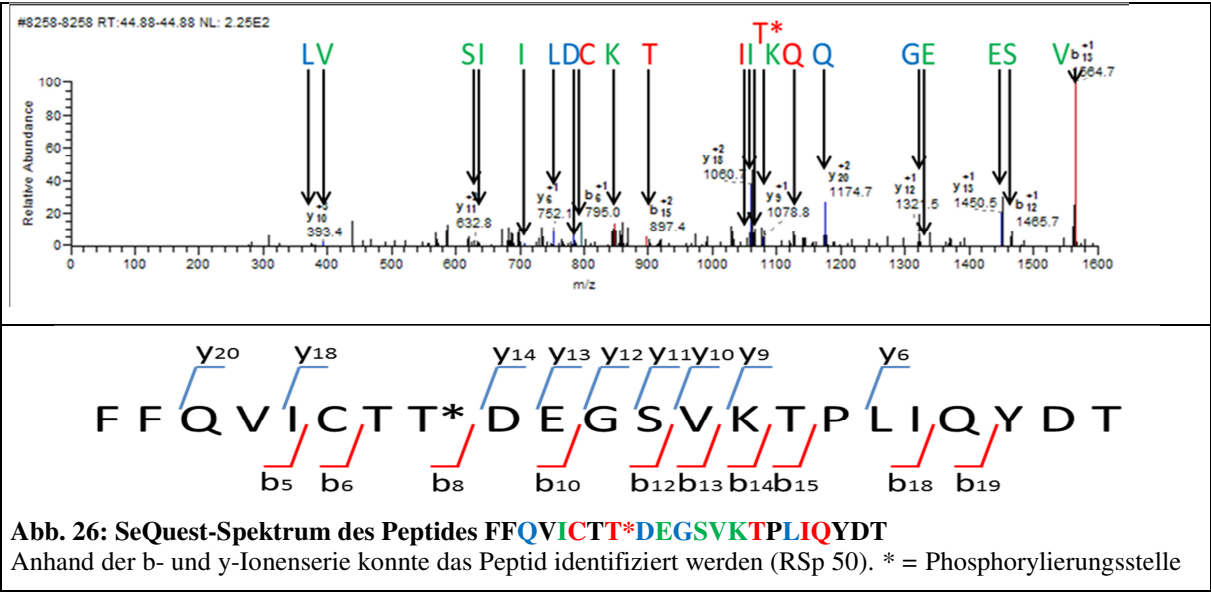
Tabelle 3: Identifiziertes Peptid und dazugehöriges Protein aus dem Überstand von K562-Zellen nach Zusatz von Bromelain						
Entsprechend der Datenbank human International Protein Index (IPI) database (version 3.87)						
Peptidsequenz	Sp	RSp	XCorr	ΔCN	Ions Cov.	Extrazelluläre Phosphorylierung bekannt
Usherin Isoform B (= Isoform 1) (O75445)						
FFQVICTT*DEGSVKTPLIQYD T (= AA 4992-5013)	547,9	50	3,296	0,173	31/126	NEIN
<i>Sp</i> Preliminary Score <i>RSp</i> Ranking Preliminary Score <i>XCorr</i> Cross Correlation Score <i>ΔCN</i> Delta Correlation Value <i>Ions Cov.</i> Ions Coverage. Erläuterungen zu den SeQuest-Parametern s. <i>Kap. 2.5.2.2.</i> * = Phosphorylierung T,S,Y. Die Angabe, ob die gefundene Phosphorylierungsstelle bekannt ist oder nicht, wurde über die Datenbank www.phosphosite.org ermittelt.						

Massenspektrum des aufgeführten Peptids:

Die im Spektrum abgebildeten Aminosäuren aus dem gefundenen Peptid sind im Folgenden in der Aminosäuresequenz wie oben angegeben farblich markiert.

Abb. 26 zeigt das Massenspektrum des auf K562-Zellen nach Abspaltung mit Bromelain identifizierten Peptids.

Usherin Isoform B:



d) K562-Zellen ohne Bromelain

In Tab. 4 ist das auf K562-Zellen aus der Negativkontrolle, d.h. ohne proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domänen der Membranproteine, mit dem SeQuest-Algorithmus ermittelte Peptid und dazugehörige Protein aufgeführt

Tabelle 4:Identifiziertes Peptid und dazugehöriges Protein aus dem Überstand von K562-Zellen ohne Zusatz von Bromelain						
Entsprechend der Datenbank human International Protein Index (IPI) database (version 3.87)						
Peptidsequenz	Sp	RSp	XCorr	ΔCN	Ions Cov.	Extrazelluläre Phosphorylierung bekannt
Protein tyrosine phosphatase receptor type D isoform 3 (P23468)						
EMVKEIS*IPEEVPTG (= AA 906-920)	2742,2	3	3,390	0,133	38/84	NEIN
Sp Preliminary Score RSp Ranking Preliminary Score XCorr Cross Correlation Score CN Delta Correlation Value Ions Cov. Ions Coverage. Erläuterungen zu den SeQuest-Parametern s. Kap. 2.5.2.2. * = Phosphorylierung T,S,Y. Die Angabe, ob die gefundene Phosphorylierungsstelle bekannt ist oder nicht, wurde über die Datenbank www.phosphosite.org ermittelt.						

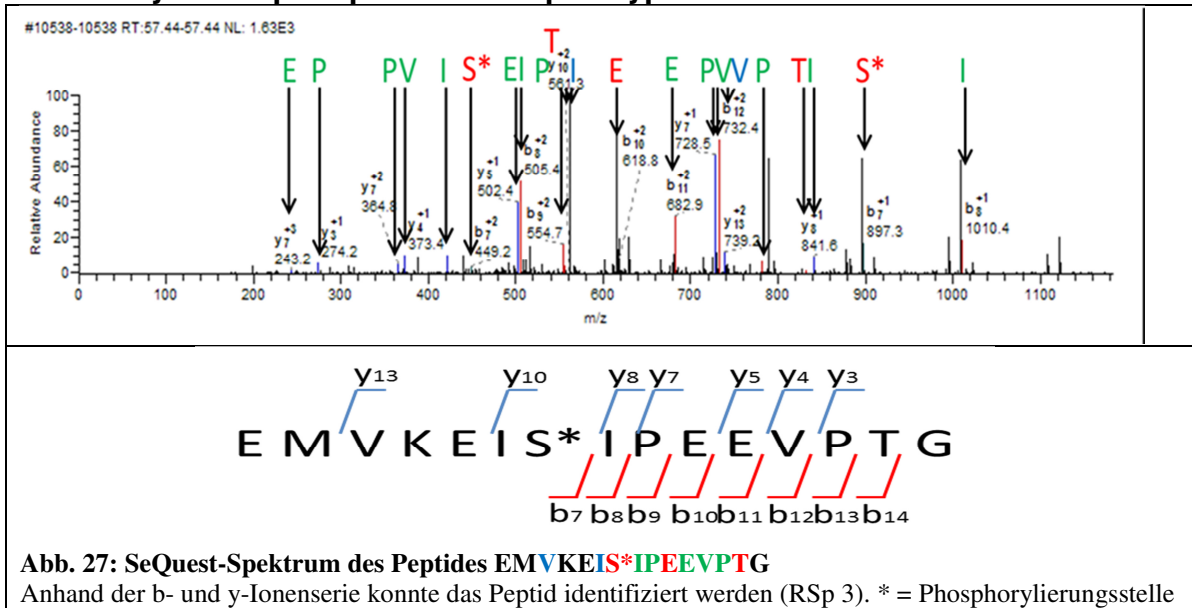
Massenspektrum des aufgeführten Peptids:

Die im Spektrum abgebildeten Aminosäuren aus dem gefundenen Peptid sind im Folgenden in der Aminosäuresequenz wie oben angegeben farblich markiert.

3 Ergebnisse

Abb. 27 zeigt das Massenspektrum des in der Negativkontrolle des K562-Ansatzes identifizierten Peptids.

Protein tyrosine phosphatase receptor type D isoform 3:



4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden zwei neue Methoden entwickelt und evaluiert, mit der extrazellulär phosphorylierte Membranproteine (Ektophosphoproteine) auf HUVECs und K562-Zellen isoliert und identifiziert werden können. Diese Methoden sollen eine Möglichkeit bieten, um potentielle spezifische Substrate von Ektoproteinkinasen zu identifizieren. In den bisherigen Studien zu Ektoproteinkinasen, welche bereits seit den 1970er Jahren durchgeführt wurden, lag das Hauptaugenmerk auf dem Nachweis von Ektoproteinkinasen auf Zellen unterschiedlicher Gewebe, aber weniger auf deren Substraten. Somit ist die Funktion von Ektoproteinkinasen bisher noch nicht umfassend verstanden.

Als Zielzellen wurden HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) und K562-Zellen, eine menschliche Leukämiezelllinie, eingesetzt, auf denen jeweils bereits Ektoproteinkinasen nachgewiesen worden sind^{36,67,80,94}. Mithilfe der hier evaluierten Methoden konnten 4 Ektophosphoproteine auf HUVECs (NOTCH 1, Otopetrin 1, Regulator of G-protein signalling 13 und Protein tyrosine phosphatase receptor type D isoform 3) und 1 Ektophosphoprotein auf K562-Zellen (Usherin isoform B) gefunden werden, welche als potentielle Substrate von Ektoproteinkinasen in Frage kommen könnten. Diese Methoden sowie die gefundenen Ektophosphoproteine sollen im Folgenden diskutiert werden.

4.1 Isolierung und Identifikation von Ektophosphoproteinen auf HUVECs und K562-Zellen

In der ersten der von uns angewandten Methoden wurden extrazellulär phosphorylierte Membranproteine auf der Zelloberfläche an ihren phosphorylierten Aminosäuren (Serin, Threonin, Tyrosin) mit biotinylierten anti-phosphoAminosäure-Antikörpern markiert und anschließend mithilfe von Detergenzien aus der Zellmembran gelöst. Die Ektophosphoproteine sollten dann durch Ausnutzung der Biotin-Streptavidin-Bindung mithilfe von Streptavidin-Agarose-Beads aus dem Zelllysate isoliert werden (vgl. Kap. 2.3.3). Mit dieser Methode konnten jedoch in der massenspektrometrischen Analyse keine Ektophosphoproteine nachgewiesen werden und auch die einzelnen Fraktionen der Streptavidin-Agarose-Säule (vgl. Abb. 12) zeigten nicht die erwarteten Ergebnisse: im Durchfluss und den Waschfraktionen erwarteten wir alle nicht durch Antikörper

markierten Proteine. Die Eluatfraktion sollte nach Spalten der Antigen-Antikörper-Bindung die Ektophosphoproteine enthalten. Schließlich wurden in der Regeneratfraktion die biotinylierten anti-phosphoAminosäure-Antikörper erwartet, welche mithilfe eines sauren Regeneratpuffers von den Streptavidin-Beads getrennt wurden (vgl. *Kap. 2.3.3, Abb. 1*). Die elektrophoretische Aufspaltung und die massenspektrometrische Analyse der einzelnen Fraktionen zeigten jedoch in allen Fraktionen einen großen Überschuss an intrazellulären Proteinen (vgl. *Kap. 3.1.2 und Kap. 3.1.3*). Dies bedeutet, dass auch nicht Biotin-markierte Proteine, und zwar überwiegend intrazelluläre Proteine, an die Streptavidin-Beads binden. Trotz mehrfacher Waschschrte mit dem Detergenzienhaltigen Waschpuffer, sowie der Elution mit einem sauren Elutionspuffer fanden sich zudem immer noch intrazelluläre Proteine in der Regeneratfraktion. Zur Regeneration der Streptavidin-Beads wurde ein saurer Regeneratpuffer eingesetzt, welcher die Biotin-Streptavidin-Bindung spalten kann. Dies zeigt, dass die Proteinbindung an Streptavidin sehr fest ist. Eine andere Fehlermöglichkeit, welche das Fehlen von Ektophosphoproteinen in der Eluatfraktion erklären könnte, ist die Spaltung der Antigen-Antikörper-Bindung der biotinylierten Antikörper an die Ektophosphoproteine durch die verwendeten Detergenzien schon beim Lösen der Proteine aus der Zellmembran, so dass letztere keine Bindungsstelle mehr für Streptavidin besitzen. Desweiteren könnte die Anwesenheit von Detergenzien auch die Bindung der Antigen-Antikörper-Komplexe an die Streptavidin-Agarose-Beads verhindern. Beides konnte in entsprechenden Versuchen ausgeschlossen werden (vgl. *Kap. 3.1.2 bzw. Kap. 3.1.3*). Auch die zuverlässige Bindung der biotinylierten Antikörper an phosphorylierte Aminosäuren auf Membranproteinen konnte nachgewiesen werden (vgl. *Kap. 3.1.1*). Aus diesen Ergebnissen schlossen wir, dass es zu einer festen unspezifischen Bindung von intrazellulären Proteinen an die Streptavidin-Agarose-Beads und zu einer Sättigung ihrer Bildungsstellen kommt. Eine solche unspezifische Bindung von Proteinen an Streptavidin ist in der Literatur vorbeschrieben⁹⁹. Zum einen betrifft dies vor allem Zelloberflächenproteine, welche an die extrazelluläre Matrix, insbesondere Fibronectin, binden. Streptavidin besitzt eine Peptidsequenz (Arg-Tyr-Asp, RYD), welche der Bindungsstelle von Fibronectin für entsprechende Zelloberflächenrezeptoren ähnelt und welche insbesondere Zelloberflächenproteine unspezifisch binden kann^{100,101}. Zum anderen sind in der Mitochondrienmatrix biotinhaltige Proteine enthalten, welche ebenso wie die von uns mit biotinylierten Antikörpern markierten Zellmembranproteine an Streptavidin binden können¹⁰². Diese Eigenschaften können also in einem Proteingemisch und insbesondere in einem Zelllysats zu einem hohen Anteil an unspezifischer Proteinbindung

von intra- und extrazellulären Fibronectin-bindenden Proteinen bzw. biotinhaltigen Proteinen an Streptavidin führen. Diese können den ohnehin äußerst geringen Anteil an markierten Phosphoektoproteinen im Zelllysat maskieren, und die somit fehlende Aufreinigung führt dazu, dass Ektophosphoproteine mit der empfindlichen Methode der Massenspektrometrie in einem großen Proteinüberschuss nicht mehr nachweisbar sind. Um die Biotin-Streptavidin-Bindung zur Isolierung von Phosphoektoproteinen aus einem Zelllysat ausnutzen zu können, müsste also ein Vorreinigungsschritt zur Reduktion von anderen Streptavidin-bindenden Proteinen im Zelllysat eingesetzt werden.

Als weitere Methode zur Isolierung von Ektophosphoproteinen wurden mithilfe der Protease Bromelain Ektodomänen sämtlicher Membranproteinen auf HUVECs und K562-Zellen abgespalten und nach der Aufreinigung der Phosphopeptide durch Größenausschlussfiltration und immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC) massenspektrometrisch analysiert. Mit dieser Methode konnten vier extrazellulär phosphorylierte Membranproteine auf HUVECs (NOTCH 1, Otopetrin 1, Regulator of G-protein signalling 13, Protein tyrosine phosphatase receptor type D isoform 3) und ein extrazellulär phosphoryliertes Membranprotein auf K562-Zellen (Usherin isoform B) gefunden werden, welche in *Kap. 4.2* ausführlicher dargestellt werden. In der Analyse der falsch positiven Ergebnisse aus den Kontrollansätzen ohne Bromelain wurden keine extrazellulär phosphorylierten Peptide auf HUVECs gefunden. Auf K562-Zellen aus dem Kontrollansatz wurde dagegen PTPRTD identifiziert. Dies wurde im Folgenden jedoch mit erwähnt, da ein „ectodomain shedding“ für die Protein-Tyrosin-Phosphatasen bekannt ist¹⁰³, welches dessen Vorhandensein im Kontrollansatz erklären kann. PTPRTD wurde als extrazellulär phosphoryliertes Membranprotein auch auf HUVECs gefunden. Auch bei dieser Methode ergab sich ein Überschuss an intrazellulären Phosphoproteinen (48 Proteine im Falle von HUVECs, 30 im Falle von K562-Zellen). Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse scheint der Ansatz für adhärente Zellen wie HUVECs geeigneter zu sein als für eine Zellsuspension wie bei K562-Zellen der Fall, da sich für HUVECs mehr Treffer ergaben. Es ist möglich, dass adhärente Zellen ein anderes Phosphorylierungsmuster aufweisen als Zellen in Suspension¹⁰⁴. Andererseits konnten insgesamt nur eine geringe Anzahl an Ektophosphoproteinen identifiziert werden. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass es durch den Proteinabbau auch zu einem Verlust von Ektoproteinkinasen und somit zu einer deutlich verminderten Anzahl phosphorylierter Membranproteine kommt. So kam in vielen Studien zu Ektoproteinkinasen z.B. Trypsin zum Einsatz, um die Aktivität von

Ektoproteinkinasen zu mindern^{29,33,38,50,53,58,87,90,105-108}. Für Ektoproteinkinasen auf K562-Zellen wurde in diesem Zusammenhang sogar nachgewiesen, dass sie nach Bindung an ihre Substrate von der Zelloberfläche abgespalten werden⁶⁸. Der Phosphorylierungsgrad der Zelloberflächenproteine hängt somit auch mit der Aktivität der Ektoproteinkinasen zusammen. Zudem muss für einen proteolytischen Abbau der extrazellulären Domänen von Membranproteinen von der Zelloberfläche mindestens eine Schnittstelle, bei Proteinen, welche einen oder mehrere extrazelluläre Loops bilden, mindesten zwei oder mehr Schnittstellen für die eingesetzte Protease vorhanden sein. Gegen eine Kombination verschiedener Proteasen sprach hier, dass die von uns getesteten Proteasen Papain und Trypsin ein zu hohes Aufkommen an abgestorbenen Zellen schon nach kurzer Inkubationszeit sowie eine zu geringe Proteinausbeute gezeigt hatten. Wie die oben kurz zusammengefassten Ergebnisse zeigten, ergab sich auch schon bei alleinigem Einsatz der milden Protease Bromelain ein großer Überschuss an intrazellulären Proteinen, welcher durch Absterben einzelner Zellen während des Experimentes zu erklären ist. Aufgrund der hohen Sensitivität der Massenspektrometrie können auch kleinste Mengen von verunreinigenden intrazellulären Proteinen durch ihren großen Überschuss den Nachweis der Zielproteine stören^{109,110}. Die Rate an toten Zellen wurde mithilfe der Trypanblau-Färbung ermittelt, und ergab bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten mit Bromelain, welche für eine ausreichende Proteinausbeute im Überstand notwendig war, eine Rate an abgestorbenen Zellen von etwa 2,5%. Nach ähnlichen Testungen in der Literatur ist somit mit einer Verunreinigung der Proben mit intrazellulären Proteinen von etwa 20-30% zu rechnen¹¹¹. Die Rate an toten Zellen nach Einsatz von Papain war dagegen mit bis zu 39% deutlich höher, während das für die Zellen gut verträgliche Trypsin aufgrund einer hohen Konzentration von Salzen in der Probe keine Ergebnisse erbrachte (vgl. Kap 3.2.1). Es war also bei der Entwicklung der Methoden essentiell, den Anteil an Ektoproteinen aus der Gesamtheit aller Proteine in einer Probe maximal aufzureinigen – was, wie wir bei der Lyse von Zellen durch Detergenzien zeigen konnten, bei einem Zelllysate aufgrund des riesigen Überstandes an intrazellulären Proteinen nicht gut funktioniert. Zudem muss der Anteil der während der Experimente abgestorbenen Zellen möglichst gering gehalten werden¹¹¹.

Eine weitere Erklärung für das Vorhandensein von intrazellulären Proteinen in der Probe ist, dass einige der verunreinigenden intrazellulären Phosphoproteine aktiv in den Überstand sezerniert wurden. Unter den falsch positiven Proteinen befanden sich außerdem phosphorylierte lösliche Proteine und Proteine von der Oberfläche von Blutzellen (z.B.

Tachykinin und das auf Erythrozyten vorkommende Duffy-Blutgruppenantigen). Hier handelt es sich um Serumproteine aus Rückständen des für die Experimente verwendeten FCS (fetal calf serum) bzw. Nabelschnurblut aus den verwendeten Nabelschnüren. Auch diese Phosphoproteine sind potentielle Substrate von Ektoproteinkinasen, jedoch lag unser Augenmerk auf membranständigen Ektophosphoproteinen von HUVECs bzw. K562-Zellen. Die genannten Proteine wurden ebenfalls durch Bromelain gespalten und ihre phosphorylierten Domänen verblieben auch nach der Phosphopeptidaufreinigung in der Probe. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse eine gute Verlässlichkeit der Methode, jedoch könnte die Proteinausbeute z.B. durch Einsatz einer Kombination von Proteasen oder durch Zugabe von ATP zur Stimulation der Ektophosphorylierungsvorgänge verbessert werden.

In beiden Methoden wurde zur Analyse der isolierten Membranproteine die HPLC-gekoppelte Massenspektrometrie verwendet. Der Vorteil der HPLC-gekoppelten Massenspektrometrie liegt darin, dass durch die Auftrennung auch komplexer Proben durch die HPLC genügend Zeit für eine Analyse der einzelnen Peptide bleibt (100 min. für einen Probendurchlauf). Dadurch kommt eine höhere Signalintensität zustande. Die Analyse auch kleinster Peptidkonzentrationen im Femtomolbereich wird ermöglicht. Die Elektrospray-Ionisation ist zudem ein sehr schonendes Ionisierungsverfahren für Peptide. Nachteilig ist, dass die selbst hergestellten RP-C18-Trennsäulen mit der Zeit (die Trennsäulen konnten jeweils für mehrere Durchläufe eingesetzt werden) verstopfen, so dass sich kein stabiles Spray mehr bildete, was zu einem schlechteren Signal im Massenspektrometer und zum Verlust von Probenanteilen führte. Die Identifikation der phosphorylierten Peptide aus den mit der FinniganTM Xcalibur-Software generierten Spektren erfolgte mit dem SeQuest-Algorithmus (Eng JK, McCormack AL, Yates JR, 1994 J Am Soc Mass Spectrom 5 (11): 976–989), welcher einen theoretischen Verdau aller Proteine in der durchsuchten Datenbank (in diesem Falle der human International Protein Index (IPI) database (version 3.87) des Europäischen Instituts für Bioinformatik) durchführt und die theoretischen anschließend mit den experimentellen MS/MS-Spektren abgleicht. In einer solchen Datenbank-gekoppelten Analyse liegt die Rate falsch positiver Ergebnisse bei etwa 1%^{109,110,112}. Um die Rate falsch positiver Treffer weiter zu senken, erfolgte die Sequest-Analyse nach von uns festgelegten Parametern: peptide probability 0,05, DeltaCN > 0,1 (drückt den Abstand zwischen der besten und zweitbesten Übereinstimmung aus), XCorr (die Kreuzkorrelation der Übereinstimmung des gefundenen

Peptides mit einem Peptid der Datenbank) entsprechend dem Ladungszustand des Peptides von 1,50, 2,00, 2,50 und 3,00 für die Ladungen +1, +2, +3 bzw. +4. Zudem sollte die Anzahl der am besten übereinstimmenden Peptide („number of top matches“) mindestens zwei betragen. Darüber hinaus wurden nur solche Peptide in die weitere Recherche einbezogen, welche einen Score bezüglich ihrer Wahrscheinlichkeit ($P(\text{prep})$) von mindestens $1e-004$ erreichten. Die weitere Analyse der gefundenen Peptide erfolgte nach den Informationen von Uniprot (version 136), Phosphosite und der Berechnung nach den Algorithmen Psipred 3.2 und SPOCTOPUS. Nur dann, wenn das von uns identifizierte Peptid nach mindestens zwei dieser Algorithmen Teil einer extrazellulären Domäne eines Membranproteins war, wurde das entsprechende Protein als extrazellulär phosphoryliert angenommen. Die hier vorgestellten Phosphorylierungsstellen waren laut der Datenbank Phosphosite, welche auch rein massenspektrometrische Nachweise von Phosphorylierungsstellen auflistet, nicht vorbekannt. Da es sich jedoch um biochemische Studien handelt, in denen die Versuchsbedingungen Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad von Proteinen und Peptiden haben können, wurde die Bekanntheit der Phosphorylierungsstelle von uns nicht zur Bedingung gemacht.

4.2 Ektophosphoproteine auf HUVECs und K562-Zellen

Die folgenden Ektophosphoproteine konnten mit der oben näher ausgeführten Methode der proteolytischen Abspaltung extrazellulärer Domänen von der Zelloberfläche auf Endothelzellen (HUVECs) und K562-Zellen identifiziert werden.

4.2.1 HUVECs

NOTCH 1 ist ein Rezeptor, der von Endothelzellen sowie perivaskulären Zellen exprimiert wird^{113,114}. Seine Existenz auf HUVECs ist bekannt und wird zu experimentellen Zwecken ausgenutzt¹¹⁵. Die 4 bekannten NOTCH-Rezeptoren regulieren die Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose von Endothelzellen und anderen Geweben^{114,115}. Auf diese Weise spielen sie eine wichtige Rolle in der Angiogenese, indem sie durch laterale Inhibition eine überschießende Gefäßbildung mit der Ausbildung von arteriovenösen Shunts verhindern¹¹⁴. Daneben steuert das NOTCH-System aber auch die Differenzierung von Angioblasten zu Endothelzellen sowie die weitere Spezialisierung in venöse bzw. arterielle Endothelzellen¹¹⁵. Die von uns identifizierte Phosphorylierungsstelle Tyr967 gehört zu dem langen extrazellulären Anteil des Rezeptors. Bisher wurden lediglich auf dem intrazellulären Anteil des NOTCH-Rezeptors Phosphorylierungsstellen beschrieben

(Thr1898 und Ser1901). Diese Phosphorylierung ist durch die intrazelluläre Caseinkinase II vermittelt und resultiert in einer verminderten Bindung des intrazellulären Anteils des NOTCH-Rezeptors an die DNA¹¹⁶. Die Funktion einer extrazellulären Phosphorylierung von NOTCH1 ist bisher nicht bekannt. Auch wurde NOTCH1 als spezifisches Substrat von Ektoproteinkinasen bisher nicht beschrieben. Jedoch wurde die Regulation von Angiogenese und Zelldifferenzierung bereits als Funktion von Ektoproteinkinasen auf Endothelzellen vermutet⁵⁰, so dass NOTCH1 in diesem Zusammenhang ein mögliches Substrat ist.

Otopetrin 1 ist ein Transmembranprotein, welches 12 Transmembrandomänen besitzt und bisher nur in sensorischen Epithelzellen des Gleichgewichtsorgans im Innenohr beschrieben wurde¹¹⁷. Es ist an der Aufrechterhaltung eines kalziumreichen perizellulären Milieus durch Freisetzung von Kalzium u.a. aus dem endoplasmatischen Retikulum beteiligt und ähnelt in seiner ATP-abhängigen Regulierung den purinergen P2-Rezeptoren^{117,118}. Die Untergruppe P2X dieser letztgenannten Rezeptoren dient als Ionenkanal ATP-abhängig dem Einstrom extrazellulären Kalziums in die Zelle¹¹⁹ und ist auch auf Endothelzellen des Innenohrs beschrieben worden¹²⁰. Die Phosphorylierungsstelle Thr249, welche Teil einer der extrazellulären Domänen des Transmembranproteins ist, ist bisher nicht beschrieben worden. Diese extrazelluläre Phosphorylierung könnte an der Regulation des Kalziumausstroms durch den Ionenkanal beteiligt sein.

Regulator of G-protein signalling 13 ist ein kleines Transmembranprotein aus der Gruppe der G-Protein regulierenden Proteine, welche wie ihre Substrate, die G-Proteingekoppelten Rezeptoren, in nahezu allen Zellarten vorkommen und an fast allen Zellfunktionen beteiligt sind¹²¹. RGS13 gehört zu der Untergruppe R4 der G-Protein regulierenden Proteine, welche auf Endothelzellen eine Rolle in der NO-vermittelten Vasodilatation (RGS2¹²²), der NO-vermittelten Angiogenese (RGS4¹²³) und der ERK(*Extracellular Regulated Kinases*)-vermittelten Atherosklerosebildung¹²⁴ spielen. In letzterem Falle sind RGS (RGS2-5) an der Regulation der Phosphorylierung der ERKs beteiligt¹²⁴. Das von uns identifizierte RGS13 wurde bisher nicht auf Endothelzellen, sondern insbesondere auf Zellen des Immunsystems (B-Lymphozyten und Mastzellen¹²⁵) und in kardialen Fibroblasten¹²¹ beschrieben. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der Mitglieder der Untergruppe R4 der G-Protein regulierenden Proteine zeigt jedoch eine große Ähnlichkeit. So unterscheidet sich das von uns identifizierte Peptid

DSY*PRFLKSEMYQKL von RGS13 nur an den unterstrichenen 4 Positionen von dem entsprechenden Peptid von RGS2 (NSY*PRFLESEFYQDL), so dass es sich hier bei nur einem identifizierten Peptid auch um eine Fehlidentifikation und Verwechslung mit RGS2 handeln könnte. Die von uns identifizierte Phosphorylierungsstelle Tyr137 auf RGS13 (bzw. Tyr186 auf RGS2) liegt in beiden Fällen extrazellulär und wurde bisher nicht vorbeschrieben. Ihre Phosphorylierung durch Ektoproteinkinasen auf Endothelzellen könnte z.B. eine Rolle in der Regulation der Ausschüttung von Vasodilatoren spielen. Diesbezüglich ist bekannt, dass ATP an der Steuerung solcher vaskulären Funktionen beteiligt ist¹²⁶. Es existiert auch eine zytoplasmatische Form der RGS, welche nach Translokation in den Nucleus die Genexpression regulieren kann¹²⁷. Somit ist hier auch eine Freisetzung des Proteins aus im Verlauf der Experimente abgestorbenen Zellen möglich, jedoch wurde in den Proben kein intrazelluläres Peptid des Proteins gefunden.

Protein tyrosine phosphatase receptor type D isoform 3 (PTPRTD): Rezeptoren aus der Gruppe der Protein-Tyrosin-Phosphatasen wurden unter anderem auf Endothelzellen, insbesondere dem Endothel der Lunge nachgewiesen¹²⁸. Der hier isolierte PTPRTD wurde jedoch vorwiegend in Nierengewebe und in hoher Konzentration in Neuronen nachgewiesen, wo er an der Neuritenbildung¹²⁹ und transsynaptischen Adhäsion beteiligt ist^{130,131}. Die Gruppe der Protein-Tyrosin-Phosphatasen ist neben der Zellproliferation vor allem auch an der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion^{103,129} beteiligt. PTPRTD ist eine membrangebundene Tyrosinphosphatase, in deren großer extrazellulärer Domäne wir die bisher nicht bekannte Phosphorylierungsstelle Ser912 identifizieren konnten. Diese liegt in einer Domäne vom sogenannten Fibronectin-Typ III¹⁰³, welche dem Protein Fibronectin im Aufbau ähnelt. Dies ist besonders interessant, da Fibronectin, ein Protein der extrazellulären Matrix, von Imada et al. als spezifisches Substrat einer Ektoproteinkinase auf Fibroblasten beschrieben⁴⁴ wurde. Diese Phosphorylierung von Fibronectin durch Ektoproteinkinasen bewirkt eine verstärkte Bindung an Oberflächenrezeptoren adhäsiver Zellen^{44,45}. Die Phosphorylierung eines Fibronectin-haltigen Rezeptors durch Ektoproteinkinasen auf Endothelzellen zur Regulation von deren Zell-Matrix-Interaktionen ist somit denkbar, wenn auch bisher nicht vorbeschrieben. Die Protein-Tyrosin-Phosphatasen sind bekanntermaßen an der Zell-Zelladhäsion, besonders innerhalb des Endothels, beteiligt¹²⁸. Diese Funktion könnte somit ebenfalls durch Ektoproteinkinasen gesteuert werden.

4.2.2 K562-Zellen

Usherin isoform B wurde als einziges Protein von der Zelloberfläche von K562-Zellen isoliert. Das Protein, dessen Genmutation zu dem sogenannten „Ushersyndrom“ führt, welches Retinitis pigmentosa sowie Störungen des Hör- und Vestibularorgans in unterschiedlicher Ausprägung verursacht, ist am besten in der Retina und der Cochlearmembran untersucht¹³². Es existiert jedoch auch in vielen anderen Geweben wie z.B. lymphatischen Organen wie Thymus oder Milz¹³³ und auch in epithelialen Zellen¹³⁴. Seine Existenz auf Immunzellen selber ist bisher nicht untersucht worden. Ähnlich wie der oben beschriebene PTPRTD besitzt auch Usherin in seinem großen extrazellulären Anteil mehrere Domänen vom Fibronectin- Typ III. Die von uns gefundene Phosphorylierungsstelle Thr4999 ist in einer solchen Domäne lokalisiert. Usherin ist bisher nicht als spezifisches Substrat einer Ektoproteinkinase beschrieben worden. Jedoch ist das Protein Fibronectin als Substrat von Ektoproteinkinasen auf der Oberfläche von Fibroblasten wie oben näher ausgeführt bekannt und bewirkt in seiner phosphorylierten Form eine verstärkte Bindung an Oberflächenrezeptoren adhäsiver Zellen⁴⁴. Usherin interagiert über seine fibronectinähnlichen Domänen ebenfalls durch Bindung an Kollagen IV mit der extrazellulären Matrix¹³³. Diese Funktion könnte also durch eine Phosphorylierung begünstigt werden und auf Immunzellen z.B. eine Rolle bei der Zellmotilität und Endothelpermeation spielen. Ähnliches wurde schon bei der Phosphorylierung von Laminin-1, ebenfalls einem Protein der extrazellulären Matrix, durch Ektoproteinkinasen auf Monozyten³⁸ sowie bei der Phosphorylierung des Oberflächenrezeptors CD98 auf Jurkat-Zellen durch Ektoproteinkinasen³⁵ vermutet.

Protein tyrosine phosphatase receptor type D isoform 3 (PTPRTD): wie schon auf HUVECs konnte der PTPRTD auch auf K562-Zellen nachgewiesen werden. Neben ihrer oben beschriebenen Funktion bei der Zell-Zell-Adhäsion sind Protein-Tyrosin-Phosphatasen auch auf hämatopoetischen Zellen und T-Lymphozyten beschrieben worden¹³⁵. In letzteren steuern sie die Zelldifferenzierung sowie die Signaltransduktion durch den T-Zell-Rezeptor¹³⁵. Ebenso wie die Protein-Tyrosin-Phosphatase LAR (*Leukocyte common antigen-related molecule*), welche auf T-Lymphozyten und hämatopoetischen Zellen vorbeschrieben ist¹³⁵, gehört auch der hier auf K562-Zellen identifizierte PTPRTD in die Untergruppe IIa der Protein-Tyrosin-Phosphatasen¹²⁹. Die hier ebenfalls von uns erstmalig beschriebene Phosphorylierungsstelle Ser912 liegt im extrazellulären Teil des Rezeptors. Sie liegt innerhalb einer Domäne vom Fibronectin-Typ

III¹⁰³, welche wie oben bereits beschrieben als Substrat von Ektoproteinkinasen bereits vorbeschrieben wurde⁴⁴. Hier ist eine Phosphorylierung von PTPRDT durch Ektoproteinkinasen nicht unwahrscheinlich. Die Phosphorylierung von Proteinen der extrazellulären Matrix durch Ektoproteinkinasen auf Immunzellen ist ebenfalls wie oben aufgeführt bekannt: die Phosphorylierung von Laminin-1 und dem Rezeptor CD98 durch Ektoproteinkinasen auf Immunzellen bewirkt ähnlich wie die von Fibronectin eine verstärkte Bindung an die Matrixoberfläche³⁸. PTPRDT wurde in der Negativkontrolle – d.h. ohne Zugabe der Protease Bromelain – identifiziert. Es ist jedoch bekannt, dass der extrazelluläre Anteil von PTPRDT im Rahmen eines „ectodomain shedding“, welches der Desensibilisierung und Inaktivierung des Rezeptors dient, abgespalten werden¹⁰³ und auf diese Weise in den Überstand der Negativkontrolle gelangt sein kann.

Zusammenfassend ergeben sich mit der hier beschriebenen Methode Ektophosphoproteine auf Endothelzellen (HUVECs) und auf Immunzellen (K562-Zellen), welche potentielle Substrate von Ektoproteinkinasen sind, jedoch als solche bisher nicht beschrieben wurden. In ihrer Funktion ähneln sie bereits bekannten Substraten von Ektoproteinkinasen, und ihre Phosphorylierung durch Ektoproteinkinasen kann eine Regulierung ihrer jeweiligen Funktion bewirken. Im Mittelpunkt solcher Phosphorylierungsvorgänge steht das Vorhandensein von ATP, welches für die beschriebenen Vorgänge in ausreichender Menge bereitstehen muss. Die Freisetzung von ATP wurde auf Endothelzellen^{82,136-138}, und insbesondere auch auf den für diese Arbeit verwendeten HUVECs^{126,139-141}, nachgewiesen, getriggert z.B. durch Scherkräfte während der Änderung des Blutflusses^{76,82} oder den Einfluss verschiedener Agonisten, wie z.B. Thrombin¹³⁹. Daneben wird ATP auch von Blutzellen wie Thrombozyten³³, Erythrozyten¹⁴², Immunzellen (Makrophagen und Lymphozyten) oder Gewebszellen im Rahmen einer Entzündungsreaktion oder Verletzung^{143,144} freigesetzt. Ähnliches gilt für perivaskuläre Nervenzellen¹³⁶. Schon 1990 diskutierten Ehrlich et al. eine mögliche Beziehung der ATP-sezernierenden Zelle mit den damit zusammenhängenden Funktionen von Ektoproteinkinasen auf ihrer Oberfläche⁶⁴. Neben dem Nachweis von Ektoproteinkinasen auf der Oberfläche von Endothelzellen^{50,80} konnte auch gezeigt werden, dass diese ATP zu ADP degradieren^{138,145}. Zudem wurden Ektophosphatasen auf Endothelzellen nachgewiesen⁶⁷. Es existiert somit ein extrazelluläres Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungssystem in der Umgebung von Endothelzellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von ATP zu einer Migration von

Endothelzellen und einer Aktivierung von Adhäsionsfaktoren, wie z.B. Integrinen, führt¹⁴⁶ sowie zu einem Wachstum der Endothelzellen¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Eine Beteiligung von Ektoproteinkinasen an diesen Vorgängen wurde in einigen Fällen nachgewiesen: Substrate von Ektoproteinkinasen spielen eine Rolle im Wachstum (Fibroblast growth inhibitor^{39,70}, Neuritenwachstum²⁸), in der Zell-Matrix- (Fibrinogen³³, CD36^{25,37,43}, Vitronectin^{41,45}, Fibronectin⁴⁴, Kollagen XVII⁴⁰, Interferon γ ⁶⁷) bzw. Zell-Zell-Adhäsion (CD98³⁵) und der Motilität von Zellen⁷⁹. Die von uns in der vorliegenden Studie gefundenen Ektophosphoproteine erfüllen ähnliche Aufgaben: der Rezeptor NOTCH1, welcher an der Zellproliferation und –differenzierung beteiligt ist, sowie die Proteine PTPRTD und Usherin, welche durch ihre Fibronectin-ähnlichen Domänen mit der extrazellulären Matrix interagieren und auf HUVECs und K562-Zellen nachgewiesen wurden. Die Phosphorylierung dieser Membranproteine durch Ektoproteinkinasen könnte somit ebenfalls das Wachstum⁴⁵, die Zell-Matrix-^{44,146}, bzw. Zell-Zell-Adhäsion¹³⁷ und die Motilität von Endothelzellen¹⁴⁶ regulieren und somit Teil eines durch Ektoproteinkinasen, ATP und Ektophosphatasen gebildeten extrazellulären Phosphorylierungssystems sein. Nachdem bereits in vielen vorangegangenen Studien das Radionuklid [γ^{32} -P]ATP zum Einsatz kam^{27,31,33,35,38,40,41,49,51,69,150}, um damit Ektophosphoproteine zu markieren, wäre es in Zukunft lohnenswert durch die Gabe von ATP bzw. die Stimulation der ATP-Ausschüttung mit der oben beschriebenen Methode eine größere Anzahl an Ektophosphoproteinen zu identifizieren. Damit könnte man den tatsächlichen Zusammenhang der gefundenen Proteine und Ektoproteinkinasen untersuchen.

5 Ausblick

Bei den von uns identifizierten Phosphoproteinen handelt es sich um extrazellulär phosphorylierte Membranproteine, welche als solche potentielle Substrate von Ektoproteinkinasen sind. Um die Funktion von Ektoproteinkinasen auf Endothelzellen besser zu beleuchten, muss in Anschlussexperimenten der Zusammenhang zwischen Ektoproteinkinasen auf Endothelzellen bzw. Immunzellen und den hier gefundenen extrazellulär phosphorylierten Membranproteinen hergestellt und bewiesen werden. Dies könnte z.B. mithilfe von spezifischen Antikörpern gegen die von uns nachgewiesenen Phosphorylierungsstellen oder den Einsatz von Radionukliden (z.B. $[\gamma^{32}\text{-P}]\text{ATP}$) geschehen. Nachdem gezeigt wurde, dass die hier entwickelte Methode des Abbaus von extrazellulären Domänen von Membranproteinen gut funktioniert, könnte basierend darauf der Weg bereitet werden, um weitere mögliche Substrate von Ektoproteinkinasen mit den Methoden der Massenspektrometrie zu finden. Nach unseren Experimenten stellte sich hier Bromelain als passende Protease für die Abspaltung extrazellulärer Domänen von Membranproteinen von der Zelloberfläche heraus und wurde zu diesem Zweck vorzugsweise eingesetzt. Dies führt jedoch nur zu einer Abspaltung eines Teils der vorhandenen Membranproteine, welche entsprechende Schnittstellen besitzen. Eine Abspaltung von Proteinen mit einem oder mehreren extrazellulären Loops ist beim Einsatz von nur einer Protease jedoch erschwert. In weiteren Experimenten könnte somit eine Mischung aus verschiedenen Proteasen eingesetzt werden. Jedoch stellt die Massenspektrometrie sehr hohe Ansprüche an die Intaktheit der eingesetzten Zellpopulation. Zwei Proteasen – Papain und Trypsin – haben sich aufgrund zu hoher Raten an abgestorbenen Zellen bei zu geringer Proteinausbeute bereits als ungeeignet erwiesen. Die relativ geringe Anzahl an Treffern in der hier vorgestellten Studie, aber auch die geringe Anzahl an bisher in der Literatur nachgewiesenen membranständigen Substraten von Ektoproteinkinasen trotz des Einsatzes von $[\gamma^{32}\text{-P}]\text{ATP}$, welcher, da unspezifisch, viele extrazelluläre Phosphoproteine erfassen kann, zeigt die Schwierigkeit extrazellulär phosphorylierte Membranproteine zu isolieren und zu identifizieren. Auf der anderen Seite wurden in vielen der oben zitierten Studien neben den dort identifizierten Phosphoproteinen auch solche Phosphoproteine gefunden, die nicht identifiziert wurden. Hier eröffnet die Methode der Massenspektrometrie eine empfindliche Identifikationsmethode. Um die extrazelluläre Proteinphosphorylierung durch Ektoproteinkinasen zu erhöhen, wäre auch die Gabe von ATP bzw. die Stimulation der

5 Ausblick

endogenen ATP-Freisetzung aus HUVECs, z.B. durch Zugabe von Thrombin oder Einsatz von Scherkräften, sinnvoll. Durch die Identifizierung von Substraten von Ektoproteinkinasen auf Endothelzellen kann deren Funktion in einzelnen Zellvorgängen, die Rolle extrazellulären ATPs bei verschiedenen Stoffwechselvorgängen, als auch deren Funktion in komplexeren Stoffwechselvorgängen und Erkrankungen des Gefäßsystems, wie z.B. der Atheroskleroseentstehung, der Thrombosebildung¹⁵¹ oder der Wundheilung³⁶ aufgedeckt und beleuchtet werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Hubmacher D, Apte SS. The biology of the extracellular matrix: novel insights. *Curr Opin Rheumatol* 2013;25:65-70.
2. Kirouac DC, Ito C, Csaszar E, et al. Dynamic interaction networks in a hierarchically organized tissue. *Mol Syst Biol* 2010;6:417.
3. Leto D, Saltiel AR. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:383-96.
4. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost* 2002;88:186-93.
5. Futosi K, Fodor S, Mocsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol* 2013;17:638-50.
6. Geiger B, Yamada KM. Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3.
7. Gerthoffer WT. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res* 2007;100:607-21.
8. Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* 2010;188:11-9.
9. Siddle K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J Mol Endocrinol* 2011;47:R1-10.
10. Graves JD, Krebs EG. Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacol Ther* 1999;82:111-21.
11. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68:320-44.
12. Dissmeyer N, Schnittger A. The age of protein kinases. *Methods Mol Biol* 2011;779:7-52.
13. Hardie DG. Roles of protein kinases and phosphatases in signal transduction. *Symp Soc Exp Biol* 1990;44:241-55.
14. Yaffe D. Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968;61:477-83.
15. Agren G, Ronquist G. Isolation of ³²P-labelled phosphorylserine from Ehrlich mouse-ascites tumour cells suspended in an isotonic medium containing ³²P-labelled adenosine triphosphate. *Acta Physiol Scand* 1970;79:125-8.
16. DePierre JW, Karnovsky ML. Ecto-enzymes of the guinea pig polymorphonuclear leukocyte. II. Properties and suitability as markers for the plasma membrane. *J Biol Chem* 1974;249:7121-9.
17. Schlaeger E, Kohler G. External cyclic AMP-dependent protein kinase activity in rat C-6 glioma cells. *Nature* 1976;260:705-7.

18. Mastro AM, Rozengurt E. Endogenous protein kinase in outer plasma membrane of cultured 3T3 cells. Nature of the membrane-bound substrate and effect of cell density, serum addition, and oncogenic transformation. *J Biol Chem* 1976;251:7899-906.
19. Pyerin W, Burow E, Michaely K, Kubler D, Kinzel V. Catalytic and molecular properties of highly purified phosphatase/casein kinase type II from human epithelial cells in culture (HeLa) and relation to ecto protein kinase. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1987;368:215-27.
20. Kubler D, Pyerin W, Bill O, Hotz A, Sonka J, Kinzel V. Evidence for ecto-protein kinase activity that phosphorylates Kemptide in a cyclic AMP-dependent mode. *J Biol Chem* 1989;264:14549-55.
21. Walter J, Schnolzer M, Pyerin W, Kinzel V, Kubler D. Induced release of cell surface protein kinase yields CK1- and CK2-like enzymes in tandem. *J Biol Chem* 1996;271:111-9.
22. Rodriguez F, Allende CC, Allende JE. Protein kinase casein kinase 2 holoenzyme produced ectopically in human cells can be exported to the external side of the cellular membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:4718-23.
23. Hogan MV, Pawlowska Z, Yang HA, Kornecki E, Ehrlich YH. Surface phosphorylation by ecto-protein kinase C in brain neurons: a target for Alzheimer's beta-amyloid peptides. *J Neurochem* 1995;65:2022-30.
24. Skubitz KM, Ehresmann DD, Ducker TP. Characterization of human neutrophil ecto-protein kinase activity released by kinase substrates. *J Immunol* 1991;147:638-50.
25. Hatmi M, Gavaret JM, Elalamy I, Vargaftig BB, Jacquemin C. Evidence for cAMP-dependent platelet ectoprotein kinase activity that phosphorylates platelet glycoprotein IV (CD36). *J Biol Chem* 1996;271:24776-80.
26. Ehrlich YH, Davis TB, Bock E, Kornecki E, Lenox RH. Ecto-protein kinase activity on the external surface of neural cells. *Nature* 1986;320:67-70.
27. Yamauchi S, Tokita Y, Aono S, et al. Phosphorylation of neuroglycan C, a brain-specific transmembrane chondroitin sulfate proteoglycan, and its localization in the lipid rafts. *J Biol Chem* 2002;277:20583-90.
28. Nagashima K, Nakanishi S, Matsuda Y. Inhibition of nerve growth factor-induced neurite outgrowth of PC12 cells by a protein kinase inhibitor which does not permeate the cell membrane. *FEBS Lett* 1991;293:119-23.
29. Tsuji S, Yamashita T, Nagai Y. A novel, carbohydrate signal-mediated cell surface protein phosphorylation: ganglioside GQ1b stimulates ecto-protein kinase activity on the cell surface of a human neuroblastoma cell line, GOTO. *J Biochem* 1988;104:498-503.
30. Kalafatis M, Rand MD, Jenny RJ, Ehrlich YH, Mann KG. Phosphorylation of factor Va and factor VIIIa by activated platelets. *Blood* 1993;81:704-19.

31. Guthmann F, Maehl P, Preiss J, Kolleck I, Rustow B. Ectoprotein kinase-mediated phosphorylation of FAT/CD36 regulates palmitate uptake by human platelets. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1999-2003.
32. Ekdahl KN, Ronnblom L, Sturfelt G, Nilsson B. Increased phosphate content in complement component C3, fibrinogen, vitronectin, and other plasma proteins in systemic lupus erythematosus: covariation with platelet activation and possible association with thrombosis. *Arthritis Rheum* 1997;40:2178-86.
33. Babinska A, Hogan MV, Sobocki T, Sobocka MB, Ehrlich YH, Kornecki E. Identification of ecto-PKC on surface of human platelets: role in maintenance of latent fibrinogen receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H2008-19.
34. Ekdahl KN, Elgue G, Nilsson B. Phosphorylation of coagulation factor XI by a casein kinase released by activated human platelets increases its susceptibility to activation by factor XIIIa and thrombin. *Thromb Haemost* 1999;82:1283-8.
35. Nguyen HT, Dalmasso G, Yan Y, Obertone TS, Sitaraman SV, Merlin D. Ecto-phosphorylation of CD98 regulates cell-cell interactions. *PLoS One* 2008;3:e3895.
36. Eriksson S, Alston-Smith J, Ekman P. Endothelial cells release casein kinase II-like activity capable of phosphorylating fibrinogen in response to thrombin. *Thromb Res* 1993;72:315-20.
37. Ho M, Hoang HL, Lee KM, et al. Ectophosphorylation of CD36 regulates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* to microvascular endothelium under flow conditions. *Infect Immun* 2005;73:8179-87.
38. Trachana V, Christophorides E, Kouzi-Koliakos K, Koliakos G. Laminin-1 is phosphorylated by ecto-protein kinases of monocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:478-92.
39. Skubitz KM, Goueli SA. Basic fibroblast growth factor is a substrate for phosphorylation by human neutrophil ecto-protein kinase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;174:49-55.
40. Zimina EP, Fritsch A, Schermer B, et al. Extracellular phosphorylation of collagen XVII by ecto-casein kinase 2 inhibits ectodomain shedding. *J Biol Chem* 2007;282:22737-46.
41. Stepanova V, Jerke U, Sagach V, et al. Urokinase-dependent human vascular smooth muscle cell adhesion requires selective vitronectin phosphorylation by ectoprotein kinase CK2. *J Biol Chem* 2002;277:10265-72.
42. Sonka J, Kubler D, Kinzel V. Phosphorylation by cell surface protein kinase of bovine and human fibrinogen and fibrin. *Biochim Biophys Acta* 1989;997:268-77.
43. Chu LY, Silverstein RL. CD36 ectodomain phosphorylation blocks thrombospondin-1 binding: structure-function relationships and regulation by protein kinase C. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:760-7.

44. Imada S, Sugiyama Y, Imada M. Fibronectin phosphorylation by ecto-protein kinase. *Exp Cell Res* 1988;179:554-64.
45. Seger D, Seger R, Shaltiel S. The CK2 phosphorylation of vitronectin. Promotion of cell adhesion via the $\alpha(v)\beta$ 3-phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 2001;276:16998-7006.
46. Lognonne JL, Wahrmann JP. A cell surface phosphoprotein of 48 kDa specific for myoblast fusion. *Cell Differ* 1988;22:245-58.
47. Chen XY, Lo TC. Involvement of a cell surface protein and an ecto-protein kinase in myogenesis. *Biochem J* 1991;279 (Pt 2):475-82.
48. Kubler D, Reinhardt D, Reed J, Pyerin W, Kinzel V. Atrial natriuretic peptide is phosphorylated by intact cells through cAMP-dependent ecto-protein kinase. *Eur J Biochem* 1992;206:179-86.
49. Maiti A, Nath D, Dungdung SR, Majumder GC. Sperm ecto-protein kinase and its protein substrate: novel regulators of membrane fusion during acrosome reaction. *J Cell Physiol* 2009;220:394-400.
50. Pirotton S, Bouterin-Falson O, Robaye B, Boeynaems JM. Ecto-phosphorylation on aortic endothelial cells. Exquisite sensitivity to staurosporine. *Biochem J* 1992;285 (Pt 2):585-91.
51. Lautrette C, Loum-Ribot E, Petit D, Vermot-Desroches C, Wijdenes J, Jauberteau MO. Increase of Fas-induced apoptosis by inhibition of extracellular phosphorylation of Fas receptor in Jurkat cell line. *Apoptosis* 2006;11:195-204.
52. Apasov SG, Smith PT, Jelonek MT, Margulies DH, Sitkovsky MV. Phosphorylation of extracellular domains of T-lymphocyte surface proteins. Constitutive serine and threonine phosphorylation of the T cell antigen receptor ectodomains. *J Biol Chem* 1996;271:25677-83.
53. Amano F, Kitagawa T, Akamatsu Y. Protein kinase activity on the cell surface of a macrophage-like cell line, J774.1 cells. *Biochim Biophys Acta* 1984;803:163-73.
54. Myers LK, Kang ES. Modulation of natural killer cell activity by surface phosphorylation reactions. *Exp Cell Res* 1990;187:270-6.
55. Watts JD, Sanghera JS, Pelech SL, Aebersold R. Phosphorylation of serine 59 of p56lck in activated T cells. *J Biol Chem* 1993;268:23275-82.
56. Ehrlich YH, Snider RM, Kornecki E, Garfield MG, Lenox RH. Modulation of neuronal signal transduction systems by extracellular ATP. *J Neurochem* 1988;50:295-301.
57. Hendley ED, Whittemore SR, Chaffee JE, Ehrlich YH. Regulation of norepinephrine uptake by adenine nucleotides and divalent cations: role for extracellular protein phosphorylation. *J Neurochem* 1988;50:263-73.

58. Pawlowska Z, Hogan MV, Kornecki E, Ehrlich YH. Ecto-protein kinase and surface protein phosphorylation in PC12 cells: interactions with nerve growth factor. *J Neurochem* 1993;60:678-86.
59. Greene LA. Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium. *J Cell Biol* 1978;78:747-55.
60. Hashimoto S, Hagino A. Blockage of nerve growth factor action in PC12h cells by staurosporine, a potent protein kinase inhibitor. *J Neurochem* 1989;53:1675-85.
61. Gordon JL. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 1986;233:309-19.
62. Soslaw G, Parker J. Modulation of platelet function by extracellular adenosine triphosphate. *Blood* 1989;74:984-93.
63. Galabru J, Krust B, Hovanessian AG. A protein kinase system from platelet rich plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;113:370-6.
64. Ehrlich YH, Hogan MV, Pawlowska Z, Naik U, Kornecki E. Ectoprotein kinase in the regulation of cellular responsiveness to extracellular ATP. *Ann N Y Acad Sci* 1990;603:401-16.
65. Shaltiel S, Schvartz I, Korc-Grodzicki B, Kreizman T. Evidence for an extra-cellular function for protein kinase A. *Mol Cell Biochem* 1993;127-128:283-91.
66. Gechtman Z, Shaltiel S. Phosphorylation of vitronectin on Ser362 by protein kinase C attenuates its cleavage by plasmin. *Eur J Biochem* 1997;243:493-501.
67. Al-Nedawi KN, Pawlowska Z, Cierniewski CS. Interferon gamma bound to endothelial cells is phosphorylated by ecto-protein kinases. *Acta Biochim Pol* 1999;46:693-702.
68. Paas Y, Fishelson Z. Shedding of tyrosine and serine/threonine ecto-protein kinases from human leukemic cells. *Arch Biochem Biophys* 1995;316:780-8.
69. Bohana-Kashtan O, Pinna LA, Fishelson Z. Extracellular phosphorylation of C9 by protein kinase CK2 regulates complement-mediated lysis. *Eur J Immunol* 2005;35:1939-48.
70. Friedberg I, Belzer I, Oged-Plesz O, Kuebler D. Activation of cell growth inhibitor by ectoprotein kinase-mediated phosphorylation in transformed mouse fibroblasts. *J Biol Chem* 1995;270:20560-7.
71. Oda Y, Kuo MD, Huang SS, Huang JS. The plasma cell membrane glycoprotein, PC-1, is a threonine-specific protein kinase stimulated by acidic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* 1991;266:16791-5.
72. Kubler D. Ecto-protein kinase substrate p120 revealed as the cell-surface-expressed nucleolar phosphoprotein Nopp140: a candidate protein for extracellular Ca²⁺-sensing. *Biochem J* 2001;360:579-87.

73. Zhu X, Luo C, Ferrier JM, Sodek J. Evidence of ectokinase-mediated phosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoblasts during bone formation in vitro. *Biochem J* 1997;323 (Pt 3):637-43.
74. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91:3527-61.
75. Chen H, Herndon ME, Lawler J. The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biol* 2000;19:597-614.
76. Burnstock G. Release of vasoactive substances from endothelial cells by shear stress and purinergic mechanosensory transduction. *J Anat* 1999;194 (Pt 3):335-42.
77. Elalamy I, Said FA, Singer M, Couetil JP, Hatmi M. Inhibition by extracellular cAMP of phorbol 12-myristate 13-acetate-induced prostaglandin H synthase-2 expression in human pulmonary microvascular endothelial cells. Involvement of an ecto-protein kinase A activity. *J Biol Chem* 2000;275:13662-7.
78. Hwa C, Aird WC. The history of the capillary wall: doctors, discoveries, and debates. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H2667-79.
79. Salmi M, Jalkanen S. Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nat Rev Immunol* 2005;5:760-71.
80. Hartmann M, Schrader J. Exo-protein kinase release from intact cultured aortic endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1992;1136:189-95.
81. Bodin P, Bailey D, Burnstock G. Increased flow-induced ATP release from isolated vascular endothelial cells but not smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 1991;103:1203-5.
82. Bodin P, Burnstock G. Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38:900-8.
83. Remold-O'Donnell E. Protein kinase activity associated with the surface of guinea pig macrophages. *J Exp Med* 1978;148:1099-104.
84. Emes CH, Crawford N. Ecto-protein kinase activity in rabbit peritoneal polymorphonuclear leucocytes. *Biochim Biophys Acta* 1982;717:98-104.
85. Kang ES, Postlethwaite A, Schaeffer S, Sawhney B. Endogenous surface phosphorylation reactions and ectokinase activity in the guinea pig T lymphocyte. *Cell Immunol* 1984;87:319-26.
86. Dusenbery KE, Mendiola JR, Skubitz KM. Evidence for ecto-protein kinase activity on the surface of human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;153:7-13.
87. Geberhiwot T, Skoglund G. Ectoprotein kinase activities on non-differentiated and differentiated U-937 cells. *Cell Signal* 1995;7:423-9.
88. Redegeld FA, Smith P, Apasov S, Sitkovsky MV. Phosphorylation of T-lymphocyte plasma membrane-associated proteins by ectoprotein kinases:

implications for a possible role for ectophosphorylation in T-cell effector functions. *Biochim Biophys Acta* 1997;1328:151-65.

89. Sitkovsky MV. Extracellular purines and their receptors in immunoregulation. Review of recent advances. *Nihon Ika Daigaku Zasshi* 1998;65:351-7.

90. Redegeld FA, Caldwell CC, Sitkovsky MV. Ecto-protein kinases: ecto-domain phosphorylation as a novel target for pharmacological manipulation? *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:453-9.

91. Munzig E, Eckert K, Harrach T, Graf H, Maurer HR. Bromelain protease F9 reduces the CD44 mediated adhesion of human peripheral blood lymphocytes to human umbilical vein endothelial cells. *FEBS Lett* 1994;351:215-8.

92. Huettner JE, Baughman RW. Primary culture of identified neurons from the visual cortex of postnatal rats. *J Neurosci* 1986;6:3044-60.

93. Liu J, Han JR, Liu CC, Suiko M, Liu MC. Identification of a putative tyrosine-O-sulphate (TyrS) receptor possibly functioning in the biosynthetic transport of tyrosine-sulphated proteins in Madin-Darby canine kidney cells. *Biochem J* 1993;294 (Pt 2):407-17.

94. Paas Y, Bohana-Kashtan O, Fishelson Z. Phosphorylation of the complement component, C9, by an ecto-protein kinase of human leukemic cells. *Immunopharmacology* 1999;42:175-85.

95. Funk J, Li X, Franz T. Threshold values for detergents in protein and peptide samples for mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005;19:2986-8.

96. Banerjee P, Joo JB, Buse JT, Dawson G. Differential solubilization of lipids along with membrane proteins by different classes of detergents. *Chem Phys Lipids* 1995;77:65-78.

97. Brown MA, Wallace CS, Anamelechi CC, Clermont E, Reichert WM, Truskey GA. The use of mild trypsinization conditions in the detachment of endothelial cells to promote subsequent endothelialization on synthetic surfaces. *Biomaterials* 2007;28:3928-35.

98. Bader CR, Bertrand D, Schwartz EA. Voltage-activated and calcium-activated currents studied in solitary rod inner segments from the salamander retina. *J Physiol* 1982;331:253-84.

99. Norton R, Heuzenroeder M, Manning PA. Non-specific serum binding to streptavidin in a biotinylated peptide based enzyme immunoassay. *J Immunoassay* 1996;17:195-204.

100. Alon R, Bayer EA, Wilchek M. Cell adhesion to streptavidin via RGD-dependent integrins. *Eur J Cell Biol* 1993;60:1-11.

101. Alon R, Bayer EA, Wilchek M. Cell-adhesive properties of streptavidin are mediated by the exposure of an RGD-like RYD site. *Eur J Cell Biol* 1992;58:271-9.

102. Hollinshead M, Sanderson J, Vaux DJ. Anti-biotin antibodies offer superior organelle-specific labeling of mitochondria over avidin or streptavidin. *J Histochem Cytochem* 1997;45:1053-7.
103. Pulido R, Krueger NX, Serra-Pages C, Saito H, Streuli M. Molecular characterization of the human transmembrane protein-tyrosine phosphatase delta. Evidence for tissue-specific expression of alternative human transmembrane protein-tyrosine phosphatase delta isoforms. *J Biol Chem* 1995;270:6722-8.
104. Pfeifle J, Hagmann W, Anderer FA. Cell adhesion-dependent differences in endogenous protein phosphorylation on the surface of various cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1981;670:274-84.
105. Saito Y, Takagi K, Teshima R, Ikebuchi H, Yamazaki T, Sawada J. Role of ecto-kinase in phorbol ester-enhanced growth hormone-binding protein release from human IM-9 cells. *Mol Cell Endocrinol* 1999;152:65-72.
106. Kang ES, Chiang TM. Characterization of the major phosphoprotein and its kinase on the surface of the rat adipocyte. *Exp Cell Res* 1986;167:343-59.
107. Naik UP, Kornecki E, Ehrlich YH. Phosphorylation and dephosphorylation of human platelet surface proteins by an ecto-protein kinase/phosphatase system. *Biochim Biophys Acta* 1991;1092:256-64.
108. Volonte C, Merlo D, Ciotti MT, Calissano P. Identification of an ectokinase activity in cerebellar granule primary neuronal cultures. *J Neurochem* 1994;63:2028-37.
109. Huttlin EL, Hegeman AD, Harms AC, Sussman MR. Prediction of error associated with false-positive rate determination for peptide identification in large-scale proteomics experiments using a combined reverse and forward peptide sequence database strategy. *J Proteome Res* 2007;6:392-8.
110. Zhang J, Li J, Liu X, Xie H, Zhu Y, He F. A nonparametric model for quality control of database search results in shotgun proteomics. *BMC Bioinformatics* 2008;9:29.
111. Kubler D, Pyerin W, Kinzel V. Protein kinase activity and substrates at the surface of intact HeLa cells. *J Biol Chem* 1982;257:322-9.
112. Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* 2002;74:5383-92.
113. Limbourg FP, Takeshita K, Radtke F, Bronson RT, Chin MT, Liao JK. Essential role of endothelial Notch1 in angiogenesis. *Circulation* 2005;111:1826-32.
114. Izumi N, Helker C, Ehling M, Behrens A, Herzog W, Adams RH. Fbxw7 controls angiogenesis by regulating endothelial Notch activity. *PLoS One* 2012;7:e41116.

115. Gu JW, Rizzo P, Pannuti A, Golde T, Osborne B, Miele L. Notch signals in the endothelium and cancer "stem-like" cells: opportunities for cancer therapy. *Vasc Cell* 2012;4:7.
116. Ranganathan P, Vasquez-Del Carpio R, Kaplan FM, et al. Hierarchical phosphorylation within the ankyrin repeat domain defines a phosphoregulatory loop that regulates Notch transcriptional activity. *J Biol Chem* 2011;286:28844-57.
117. Kim E, Hyrc KL, Speck J, et al. Missense mutations in Otopetrin 1 affect subcellular localization and inhibition of purinergic signaling in vestibular supporting cells. *Mol Cell Neurosci* 2011;46:655-61.
118. Kim E, Hyrc KL, Speck J, et al. Regulation of cellular calcium in vestibular supporting cells by otopetrin 1. *J Neurophysiol* 2010;104:3439-50.
119. North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 2002;82:1013-67.
120. Wu T, Dai M, Shi XR, Jiang ZG, Nuttall AL. Functional expression of P2X4 receptor in capillary endothelial cells of the cochlear spiral ligament and its role in regulating the capillary diameter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301:H69-78.
121. Zhang P, Mende U. Regulators of G-protein signaling in the heart and their potential as therapeutic targets. *Circ Res* 2011;109:320-33.
122. Osei-Owusu P, Sabharwal R, Kaltenbronn KM, et al. Regulator of G protein signaling 2 deficiency causes endothelial dysfunction and impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation by dysregulating Gi/o signaling. *J Biol Chem* 2012;287:12541-9.
123. Jaba IM, Zhuang ZW, Li N, et al. NO triggers RGS4 degradation to coordinate angiogenesis and cardiomyocyte growth. *J Clin Invest* 2013;123:1718-31.
124. Anger T, Grebe N, Osinski D, et al. Role of endogenous RGS proteins on endothelial ERK 1/2 activation. *Exp Mol Pathol* 2008;85:165-73.
125. Bansal G, DiVietro JA, Kuehn HS, et al. RGS13 controls g protein-coupled receptor-evoked responses of human mast cells. *J Immunol* 2008;181:7882-90.
126. Bodin P, Burnstock G. ATP-stimulated release of ATP by human endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;27:872-5.
127. Xie Z, Geiger TR, Johnson EN, Nyborg JK, Druey KM. RGS13 acts as a nuclear repressor of CREB. *Mol Cell* 2008;31:660-70.
128. Sui XF, Kiser TD, Hyun SW, et al. Receptor protein tyrosine phosphatase micro regulates the paracellular pathway in human lung microvascular endothelia. *Am J Pathol* 2005;166:1247-58.
129. Nikolaienko RM, Agyekum B, Bouyain S. Receptor protein tyrosine phosphatases and cancer: new insights from structural biology. *Cell Adh Migr* 2012;6:356-64.

130. Kwon SK, Woo J, Kim SY, Kim H, Kim E. Trans-synaptic adhesions between netrin-G ligand-3 (NGL-3) and receptor tyrosine phosphatases LAR, protein-tyrosine phosphatase delta (PTPdelta), and PTPsigma via specific domains regulate excitatory synapse formation. *J Biol Chem* 2010;285:13966-78.
131. Uetani N, Chagnon MJ, Kennedy TE, Iwakura Y, Tremblay ML. Mammalian motoneuron axon targeting requires receptor protein tyrosine phosphatases sigma and delta. *J Neurosci* 2006;26:5872-80.
132. Auslender N, Bandah D, Rizel L, et al. Four USH2A founder mutations underlie the majority of Usher syndrome type 2 cases among non-Ashkenazi Jews. *Genet Test* 2008;12:289-94.
133. Bhattacharya G, Kalluri R, Orten DJ, Kimberling WJ, Cosgrove D. A domain-specific usherin/collagen IV interaction may be required for stable integration into the basement membrane superstructure. *J Cell Sci* 2004;117:233-42.
134. Zallocchi M, Sisson JH, Cosgrove D. Biochemical characterization of native Usher protein complexes from a vesicular subfraction of tracheal epithelial cells. *Biochemistry* 2010;49:1236-47.
135. Kondo S, Kishi H, Muraguchi A. Regulatory role of leukocyte-common-antigen-related molecule (LAR) in thymocyte differentiation. *Eur J Immunol* 2010;40:1296-302.
136. Burnstock G. Dual control of vascular tone and remodelling by ATP released from nerves and endothelial cells. *Pharmacol Rep* 2008;60:12-20.
137. Kolosova IA, Mirzapoiazova T, Adyshev D, et al. Signaling pathways involved in adenosine triphosphate-induced endothelial cell barrier enhancement. *Circ Res* 2005;97:115-24.
138. Pearson JD, Gordon JL. Nucleotide metabolism by endothelium. *Annu Rev Physiol* 1985;47:617-27.
139. Godecke S, Roderigo C, Rose CR, Rauch BH, Godecke A, Schrader J. Thrombin-induced ATP release from human umbilical vein endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012;302:C915-23.
140. Gruenhagen JA, Yeung ES. Investigation of G protein-initiated, Ca²⁺-dependent release of ATP from endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2004;1693:135-46.
141. Milner P, Kirkpatrick KA, Ralevic V, Toothill V, Pearson J, Burnstock G. Endothelial cells cultured from human umbilical vein release ATP, substance P and acetylcholine in response to increased flow. *Proc Biol Sci* 1990;241:245-8.
142. Bergfeld GR, Forrester T. Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovasc Res* 1992;26:40-7.

143. Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 2006;112:358-404.
144. Dubyak GR. Purinergic signaling at immunological synapses. *J Auton Nerv Syst* 2000;81:64-8.
145. Pearson JD, Carleton JS, Gordon JL. Metabolism of adenine nucleotides by ectoenzymes of vascular endothelial and smooth-muscle cells in culture. *Biochem J* 1980;190:421-9.
146. Kaczmarek E, Erb L, Koziak K, et al. Modulation of endothelial cell migration by extracellular nucleotides: involvement of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathways. *Thromb Haemost* 2005;93:735-42.
147. Ethier MF, Chander V, Dobson JG, Jr. Adenosine stimulates proliferation of human endothelial cells in culture. *Am J Physiol* 1993;265:H131-8.
148. Erlinge D, Burnstock G. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signal* 2008;4:1-20.
149. Yegutkin GG, Helenius M, Kaczmarek E, et al. Chronic hypoxia impairs extracellular nucleotide metabolism and barrier function in pulmonary artery vasa vasorum endothelial cells. *Angiogenesis* 2011;14:503-13.
150. Walter J, Schindzielorz A, Hartung B, Haass C. Phosphorylation of the beta-amyloid precursor protein at the cell surface by ectocasein kinases 1 and 2. *J Biol Chem* 2000;275:23523-9.
151. Ekdahl KN, Bengtsson AA, Andersson J, et al. Thrombotic disease in systemic lupus erythematosus is associated with a maintained systemic platelet activation. *Br J Haematol* 2004;125:74-8.

Danksagung

Meine Danksagung gilt Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Schrader, Direktor des Institutes für Molekulare Kardiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für die Bereitstellung des Themas sowie seine immer aufmunternde Unterstützung bei der Fertigstellung der Dissertation.

Ich danke Frau Dr. rer. nat. Sandra Burghoff für die Betreuung der Experimente sowie ihre ausdauernde Hilfe beim Verfassen dieser Arbeit.

Dem Graduiertenkolleg 1089 *Proteininteraktionen und –modifikationen im Herzen* danke ich für die Unterstützung der Arbeit.

Insbesondere geht mein Dank an Frau Dr. rer. nat. Simon-Buss und Herrn Dr. rer. nat. Michael Reinartz für ihre Anleitung und Hilfestellung bei der Erhebung der massenspektrometrischen Daten sowie Frau Dr. rer. nat. Sabine Metzger für ihre Ratschläge und Anregungen.

Frau Susanne Küsters und insbesondere Frau Dr. rer. nat. Barabara Emde danke ich für ihre Anleitung und Hilfestellung bei der Versuchsdurchführung.

Der Geburtshilflichen Abteilung des Krankenhauses Benrath danke ich für die Bereitstellung humaner Nabelschnüre.

Ein persönlicher Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

27.07.2014, Wibke Willberg