

**PHOSPHOHYDROXYPROLIN –  
IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG  
IN PROTEINEN**

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Axel Kühlberg**

aus Düsseldorf

Januar 2008

Aus dem Analytischen Zentrallabor des  
Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Riesner  
Korreferent: Prof. Dr. Bott

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Januar 2008

## INHALT

### Inhaltsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

### Zusammenfassung

|          |                                                               |    |
|----------|---------------------------------------------------------------|----|
| <b>1</b> | <b>EINLEITUNG</b>                                             | 1  |
| 1.1      | Funktionale Bandbreite der Proteine                           | 1  |
| 1.2      | Diversität der Proteine                                       | 2  |
| 1.3      | Posttranslationale Modifikationen                             | 2  |
| 1.4      | Phosphorylierung von Aminosäureseitenketten                   | 3  |
| 1.5      | Posttranslationale Modifikationen am Prolin und Hydroxyprolin | 5  |
| 1.5.1    | Hydroxylierung von Prolin                                     | 5  |
| 1.5.2    | Glykosylierung von Hydroxyprolin                              | 6  |
| 1.5.3    | Phosphorylierung von Hydroxyprolin                            | 6  |
| 1.6      | Untersuchte Phosphohydroxyprolin-haltige Proteine             | 8  |
| 1.6.1    | Kollagene                                                     | 8  |
| 1.6.2    | Kristalline                                                   | 11 |
| 1.7      | Identifizierung von Phosphoaminosäuren                        | 14 |
| 1.8      | Ziel der Arbeit                                               | 17 |
| <b>2</b> | <b>MATERIAL UND METHODEN</b>                                  | 19 |
| 2.1      | Chemikalien und Kollagene                                     | 19 |
| 2.2      | Radioaktive Markierung                                        | 19 |
| 2.2.1    | Zellkultur                                                    | 19 |
| 2.2.2    | [ <sup>32</sup> P]-Orthophosphat-Einbau                       | 19 |
| 2.3      | Phosphoaminosäureanalyse                                      | 20 |
| 2.3.1    | Saure Hydrolyse                                               | 20 |
| 2.3.2    | Zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese (2D-DE)            | 20 |
| 2.4      | Synthesen                                                     | 21 |
| 2.4.1    | Synthese von Phosphohydroxyprolin und Phosphohydroxylysin     | 21 |
| 2.4.2    | Synthese von Fmoc-Hydroxyprolin                               | 21 |
| 2.4.3    | Peptidsynthese                                                | 23 |
| 2.4.4    | Peptidphosphorylierung                                        | 26 |
| 2.5      | Proteinaufbereitung                                           | 29 |
| 2.5.1    | Proteinpräparation                                            | 29 |
| 2.5.2    | Gelelektrophorese (SDS-PAGE)                                  | 30 |
| 2.5.3    | Western Blot                                                  | 30 |
| 2.5.4    | Dot Blot                                                      | 31 |
| 2.5.5    | Enzymatische Proteinspaltung                                  | 31 |
| 2.5.6    | Enzymatische Dephosphorylierung                               | 31 |

|            |                                                                   |    |
|------------|-------------------------------------------------------------------|----|
| <b>2.6</b> | <b>Phosphohydroxyprolin-spezifische Antikörper</b>                | 32 |
| 2.6.1      | Herstellung von polyklonalen Antikörpern                          | 32 |
| 2.6.2      | Immunfärbung                                                      | 33 |
| 2.6.3      | ELISA                                                             | 33 |
| <b>2.7</b> | <b>Chromatographische Methoden</b>                                | 34 |
| 2.7.1      | Reversed-Phase-Chromatographie (HPLC)                             | 31 |
| 2.7.2      | Micro-Reversed-Phase-Chromatographie                              | 34 |
| <b>2.8</b> | <b>Massenspektrometrie</b>                                        | 35 |
| 2.8.1      | Massenspektrometrische Analyse                                    | 35 |
| 2.8.2      | MALDI-MS                                                          | 35 |
| 2.8.3      | ESI-MS                                                            | 36 |
| 2.8.4      | Massenanalyse mit dem ESI-QqTOF                                   | 39 |
| 2.8.5      | Sequenzierung von Proteinen und Peptiden mittels ESI-MS           | 41 |
| 2.8.6      | Positiv-Ionen-Modus und Negativ-Ionen-Modus                       | 42 |
| <b>3</b>   | <b>ERGEBNISSE</b>                                                 | 44 |
| <b>3.1</b> | <b>Nachweis von Phosphohydroxyprolin durch Aminosäureanalyse</b>  | 44 |
| 3.1.1      | Migrationsverhalten von Phosphohydroxyprolin bei der 2D-DE        | 45 |
| 3.1.2      | Phosphoaminosäureanalyse von <sup>32</sup> P-markierten Proteinen | 47 |
| 3.1.3      | Nachweis von Phosphoaminosäuren mittels ESI-MS                    | 50 |
| 3.1.4      | Massenspektrometrische Analyse von Kollagenhydrolysaten           | 54 |
| <b>3.2</b> | <b>Immunologischer Nachweis von Phosphohydroxyprolin</b>          | 57 |
| 3.2.1      | Herstellung polyklonaler Antiseren gegen Phosphohydroxyprolin     | 58 |
| 3.2.2      | Spezifität der polyklonalen Antiseren                             | 59 |
| 3.2.3      | Untersuchung von Kollagenen mit dem pHyp-spezifischen Antiserum   | 63 |
| 3.2.4      | Untersuchung von Gewebeprotein mit pHyp-spezifischem Antiserum    | 65 |
| 3.2.5      | Nachweis von Phosphohydroxyprolin mittels Western Blot            | 66 |
| 3.2.6      | Western-Blot nach enzymatischer Dephosphorylierung                | 68 |
| <b>3.3</b> | <b>Nachweis von Phosphohydroxyprolin in α-Kristallin A</b>        | 69 |
| 3.3.1      | Identifizierung der Phosphohydroxyprolin enthaltenden Proteine    | 69 |
| 3.3.2      | Charakterisierung einer Sequenzposition von Phosphohydroxyprolin  | 71 |
| <b>4</b>   | <b>DISKUSSION</b>                                                 | 78 |
| <b>4.1</b> | <b>Phosphohydroxyprolin ist eine proteinogene Aminosäure</b>      | 78 |
| <b>4.2</b> | <b>Konfiguration des nachgewiesenen Phosphohydroxyprolins</b>     | 80 |
| <b>4.3</b> | <b>Phosphohydroxyprolin-spezifische polyklonale Antikörper</b>    | 82 |
| <b>4.4</b> | <b>Möglichkeiten der Phosphorylierung von Hydroxyprolin</b>       | 82 |
| 4.4.1      | Phosphorylierung des Hydroxyprolins durch Proteinkinasen          | 82 |
| 4.4.2      | Phosphorylierung durch Inositol-Pyrophosphat                      | 84 |
| <b>4.5</b> | <b>Mögliche Funktion von Phosphohydroxyprolin</b>                 | 85 |
| 4.5.1      | Phosphohydroxyprolin in Kollagen VIII                             | 85 |
| 4.5.2      | Phosphohydroxyprolin in α-Kristallin A                            | 86 |
| <b>4.6</b> | <b>Ausblick</b>                                                   | 88 |
| <b>5</b>   | <b>LITERATUR</b>                                                  | 90 |



## Abkürzungsverzeichnis

|       |                                                                       |
|-------|-----------------------------------------------------------------------|
| AcN   | Acetonitril                                                           |
| AcOH  | Essigsäure                                                            |
| AP    | Alkalische Phosphatase                                                |
| APS   | Ammoniumpersulfat                                                     |
| AS    | Aminosäure                                                            |
| ATP   | Adenosintriphosphat                                                   |
| BSA   | Bovines Serumalbumin                                                  |
| DCM   | Dichlormethan                                                         |
| DIC   | <i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid                                   |
| DIEA  | <i>N,N</i> -Diisopropylethylamin                                      |
| DMF   | Dimethylformamid                                                      |
| DNA   | <i>Desoxyribonucleic acid</i>                                         |
| ELISA | <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>                              |
| ESI   | <i>Electrospray ionisation</i>                                        |
| FA    | Freunds Adjuvans                                                      |
| Fmoc  | 9-Fluorenylmethoxycarbonyl                                            |
| H     | Proton (nur in Verbindung mit Molekulargewicht)                       |
| HBTU  | 2-(H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat |
| HOBt  | 1-Hydroxybenzotriazol                                                 |
| HPLC  | <i>High performance liquid chromatography</i>                         |
| Hyl   | Hydroxylysin                                                          |
| Hyp   | Hydroxyprolin                                                         |
| Ig    | Immunglobulin                                                         |
| kDa   | Kilodalton                                                            |
| KLH   | <i>Keyhole limpet hemo-cyanin</i>                                     |
| M     | monoisotopisches Molekulargewicht (Molekülmasse)                      |
| MALDI | <i>Matrix assisted laser desorption/ionisation</i>                    |
| MeOH  | Methanol                                                              |
| MS    | Massenspektrometer oder Massenspektrometrie                           |
| MS/MS | Fragment-Ionen-Analyse (Tandemmassenspektrometrie)                    |
| m/z   | Masse/Ladungs-Verhältnis                                              |
| PAGE  | Polyacrylamidgelelektrophorese                                        |
| pAS   | Phosphoaminosäure                                                     |
| PEA   | Phosphoethanolamin                                                    |
| pHyl  | Phosphohydroxylysin                                                   |

|       |                                               |
|-------|-----------------------------------------------|
| pHyp  | Phosphohydroxyprolin                          |
| PBS   | <i>Phosphate buffered saline</i>              |
| PSD   | <i>Post-source decay</i>                      |
| pSer  | Phosphoserin                                  |
| pThr  | Phosphothreonin                               |
| pTyr  | Phosphotyrosin                                |
| PVDF  | Polyvinylidendifluorid                        |
| Q     | Quadrupol                                     |
| RP    | <i>Reversed phase</i>                         |
| Ser   | Serin                                         |
| SDS   | <i>Sodium dodecylsulfate</i>                  |
| TBS   | <i>Tris buffered saline</i>                   |
| TBSN  | <i>Tris buffered saline/0,1% Nonidet P-40</i> |
| TCA   | Trichloressigsäure                            |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin                      |
| TFA   | Trifluoressigsäure                            |
| Thr   | Threonin                                      |
| TLE   | Dünnschichtelektrophorese                     |
| TOF   | <i>Time-of-flight</i>                         |
| Tyr   | Tyrosin                                       |

## Zusammenfassung

Posttranslationale Modifikationen sind von entscheidender Bedeutung für die Struktur und Funktion einer Vielzahl von Proteinen. Anders als die Aminosäuresequenz der Proteine lassen sich die posttranslationalen Modifikationen nicht aus der genetischen Sequenz ableiten. Die Identifizierung einer posttranslationalen Modifikation ist deshalb nur am Protein selbst möglich. Eine verbreitete Variante der posttranslationalen Modifikation ist die *O*-Phosphorylierung von Proteinen an den Seitenketten der Hydroxyaminosäuren. Konservativen Schätzungen zufolge werden mehr als ein Drittel aller zellulären Proteine reversibel phosphoryliert.

Die *O*-Phosphorylierung der Hydroxyaminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin ist allgemein bekannt und wurde schon umfassend untersucht. Weitgehend unbekannt und kaum untersucht ist hingegen die Phosphorylierung von Hydroxyprolin. Während das Vorkommen von Phosphohydroxylysin in Kollagen schon seit mehr als zwei Jahrzehnten belegt ist, gab es bisher keinen Ansatz, Phosphohydroxyprolin in einem Protein nachzuweisen. Ziel dieser Arbeit war daher die Etablierung geeigneter Analysemethoden zum Nachweis von Phosphohydroxyprolin in einem Protein und die Identifizierung und Charakterisierung einer entsprechenden Sequenzposition.

In dieser Arbeit konnte erstmalig Phosphohydroxyprolin als proteinogene Aminosäure nachgewiesen und seine exakte Sequenzposition in dem Protein  $\alpha$ -Kristallin A identifiziert werden. Nach der Etablierung der erforderlichen Analysetechniken wurde das Gesamtprotein aus Aorta-, Augen- und Herzgewebe adulter Ratten unter besonderer Berücksichtigung des Erhaltes von *O*-Phosphoestern präpariert, mittels SDS-PAGE getrennt und im Western Blot immunologisch untersucht. Ein zu diesem Zweck hergestelltes polyklonales Antiserum mit hoher Spezifität für Phosphohydroxyprolin lieferte Hinweise auf das Vorkommen von Phosphohydroxyprolin in einigen der Proteinbanden. Die entsprechenden Proteine wurden mit Trypsin gespalten und massenspektrometrisch analysiert. Mittels ESI-MS/MS-Sequenzanalyse wurden diese Proteine als Mitglieder der Kristallin-Familie identifiziert. In  $\alpha$ -Kristallin A aus dem Augengewebe konnte eine Sequenz mit drei unterschiedlichen Modifikationszuständen eines Prolinrests nachgewiesen werden. Die unmodifizierte Sequenz mit Prolin in der Aminosäurekette lag parallel zu den modifizierten Sequenzen mit Hydroxyprolin, bzw. Phosphohydroxyprolin in der Aminosäurekette vor. Die gleichen Modifikationen des Prolins ließen sich auch in  $\alpha$ -Kristallin A aus dem Herzgewebe beobachten. Darüber hinaus fanden sich Hinweise für das Vorkommen von Phosphohydroxyprolin in Kollagen VIII.

Die Ergebnisse der Arbeit werden hinsichtlich der potentiellen Verbreitung von Phosphohydroxyprolin, dem Ursprung dieser Modifikation und der vorstellbaren Funktion von Phosphohydroxyprolin diskutiert.

## Summary

Post-translational modifications have vital importance for the structure and function of a multiplicity of proteins. In contrast to the amino acid sequence of proteins the post-translational modifications cannot be derived from the genetic code. Therefore, identification of post-translational modifications is only possible by analytical studies of the protein. *O*-phosphorylation of proteins occurring at the side chain of particular amino acids is a common version of post-translational modification. It has been conservatively estimated that more than one-third of all cellular proteins are reversibly phosphorylated.

*O*-phosphorylation of the hydroxyamino acids serine, threonine and tyrosine is well-known and was matter of extensive research. However, phosphorylation of hydroxyproline is virtually unknown and only marginally investigated. While phosphorylation of hydroxylysine in collagens has been described for more than two decades, so far there was no attempt to prove phosphohydroxyproline in proteins. Therefore, aim of this work was the establishment of adequate analytical methods to achieve evidence of phosphohydroxyproline in a protein and the identification and characterization of the according sequence position.

In this work phosphohydroxyproline was demonstrated for the first time as a proteinogenic amino acid and its exact sequence position in the protein  $\alpha$ -crystallin A was identified. After establishment of the required techniques total protein was prepared from ophthalmic, aortic and cardiac tissue of adult rats in consideration of conservation of *O*-phosphoesters. The proteinmixture was separated by SDS-PAGE and assayed immunologically by western blot analysis. For this purpose a polyclonal antiserum with high specificity for phosphohydroxyproline was generated. This antiserum recognizes phosphohydroxyproline in a couple of protein bands. The corresponding proteins were tryptically digested and analyzed by mass spectrometry. Using ESI-MS/MS sequence analysis all proteins were identified as members of the crystallin family. In  $\alpha$ -crystallin A from ophthalmic tissue a sequence with three different modification states of a proline residue was observed. Thereby the nonmodified sequence with proline in the amino acid chain was identified in parallel to the modified sequences with hydroxyproline and phosphohydroxyproline, respectively. The same modifications of proline were also observed in  $\alpha$ -crystallin A from cardiac tissue. Furthermore some clues were found for the presence of phosphohydroxyproline in collagen type VIII.

These findings are discussed concerning the potential incidence and origin of hydroxyproline phosphorylation and the conceivable function of phosphohydroxyproline.



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Funktionale Bandbreite der Proteine

Proteine nehmen unter den biogenen Makromolekülen eine zentrale Position ein und sind an nahezu allen biologischen Prozessen beteiligt. Fast alle chemischen Reaktionen in biologischen Systemen werden durch spezifische Proteine, die Enzyme, katalysiert. Erst die Enzyme ermöglichen die molekularen Transformationen des zellulären Metabolismus. Es gibt auch Proteine, die andere Moleküle oder Ionen speichern oder transportieren. Proteine erfüllen regulatorische Aufgaben, überwachen intrazelluläre und extrazelluläre Bedingungen und geben Informationen im Rahmen der Signalübertragung an andere zelluläre Komponenten weiter. Sie wachen über Wachstum und Differenzierung der Zellen durch kontrollierte Expression der genetischen Information. Proteine, in Form von Antikörpern, sind auch an der Immunabwehr beteiligt und erfüllen damit eine lebenswichtige Funktion zur Aufrechterhaltung der Integrität des Gesamtorganismus. Außerdem sind Proteine wichtige Bausteine der Zellen, ohne deren Beteiligung weder räumliche und strukturelle Organisation noch Bewegung möglich wären. Proteine erzeugen darüber hinaus mechanische oder elektrochemische Kräfte und wirken damit unmittelbar auf ihre Umgebung ein.

Diese Aufzählung der Proteinfunktionen veranschaulicht lediglich die Bandbreite ihrer Aktivität; sie kann aber nicht vollständig sein, da selbst eine Liste nur der bekannten Funktionen mehrere Tausend Einträge enthielte. Eine solche Liste unterläge zudem einem steten Wandel, da zum einen längst noch nicht alle Proteine untersucht und zum anderen noch nicht sämtliche Funktionen der bisher bekannten Proteine charakterisiert sind, zum Teil sind die Proteine sogar noch völlig unbekannt.

Die Funktion eines Proteins wird durch seine spezifische Struktur bestimmt. Proteine werden *in vivo* durch sukzessive Kondensationsreaktionen von Aminosäuren in der Reihenfolge synthetisiert, die durch die Nucleotidsequenz eines Gens vorgegeben ist. Die Aminosäuresequenz der Polypeptidkette wird auch als Primär-

struktur bezeichnet. Höhere Organisationsstufen der Proteinstruktur wie Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur beziehen sich auf die dreidimensionale Gestalt des Proteins, die letztendlich erst die Funktion des Proteins ermöglicht. Doch die Aminosäuresequenz ist stets das grundlegende Element, welches die weiteren Organisationsstufen maßgeblich bestimmt. Da jede Aminosäure charakteristische chemische und physikalische Merkmale aufweist, beeinflusst das Vorkommen einer Aminosäure an einer bestimmten Position in der Polypeptidkette die Eigenschaften des Proteins. Die funktionsbestimmende dreidimensionale Gestalt eines Proteins ist die Folge der intramolekularen Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Aminosäureseitenketten des Proteins.

## 1.2 Diversität der Proteine

Die vielen verschiedenen Funktionen werden erst durch die enorm große Diversität der Proteine möglich. Es gibt 20 verschiedene proteinogene Standardamino-säuren (exklusive der Sonderfälle Selenocystein [1, 2] und Pyrrolysin [3, 4]). Entsprechend gibt es 20 verschiedene Möglichkeiten für jede Position eines Aminosäurerestes in der Polypeptidkette. Für ein Protein mit  $n$  Aminosäureresten ergeben sich  $20^n$  mögliche Sequenzen. Bei einem Polypeptid mit nur 100 Aminosäureresten sind dies schon  $20^{100}$  mögliche Sequenzen, eine Zahl, die weitaus größer ist als die geschätzte Zahl der Atome im Universum ( $9 \times 10^{78}$ ). Die weitaus meisten Polypeptide enthalten zwischen 100 und 1000 Aminosäurereste. Es gibt aber auch deutlich kürzere und auch viel längere Sequenzen. Zusätzlich tragen noch posttranslationale Modifikationen zur Diversität der Proteine bei. Sie erfolgen während oder nach der Assemblierung der Polypeptidkette.

## 1.3 Posttranslationale Modifikationen

Die weitaus meisten eukaryotischen Proteine werden posttranslational auf spezifische Weise modifiziert. Dies kann sowohl an den terminalen Amino- und Carboxygruppen, als auch an den funktionellen Seitenketten der Aminosäuren geschehen. So sind über 150 verschiedene Arten der Seitenkettenmodifikationen bekannt. Zu den häufigsten zählen dabei die Acetylierung, Glykosylierung, Hydro-

xylierung, Methylierung, Phosphorylierung und die Ubiquitinierung. Durch die Modifikationen werden die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Aminosäureseitenketten verändert. Dies hat Auswirkungen auf die dreidimensionale Struktur und damit die Funktionsausübung eines Proteins. Die einzelnen Arten der Modifikationen sind unterschiedlich gut untersucht und über die Funktion vieler Seitenkettenmodifikationen ist noch immer wenig bekannt.

#### 1.4 Phosphorylierung von Aminosäureseitenketten

Die Phosphorylierung an den Aminosäureseitenketten in Proteinen spielt eine wichtige Rolle in biologischen Systemen. Konservativen Schätzungen zufolge werden mehr als ein Drittel aller Proteine reversibel phosphoryliert [5, 6]. Der Phosphorylierung kommt dabei oft die Funktion eines molekularen Schalters zu, der die Proteinaktivität steuert. Die Phosphorylierung ist ein grundlegender Mechanismus, der in einer lebenden Zelle an so unterschiedlichen Systemfunktionen beteiligt ist wie beispielsweise dem Zellmetabolismus, der Signaltransduktion oder der Zellteilung. Beispiele für bekannte Proteinphosphorylierungen sind:

- A) Die Phosphorylierung steuert die Aktivität eines Proteins. Sie erfolgt dabei durch eine Proteinkinase, welche die  $\gamma$ -Phosphoryl-Gruppe eines Nukleosid-Triphosphats (z.B. ATP) auf die Seitenkette einer Hydroxyaminosäure überträgt. Beispiele hierfür sind die Proteinkinase A (Phosphoserin, Phosphothreonin) [7] oder verschiedene Rezeptortyrosinkinasen (Phosphotyrosin) [8].
- B) Die Phosphorylierung ist an enzymatischen Reaktionen beteiligt. In diesen Fällen ist das phosphorylierte Protein ein Reaktionsintermediat (meist *S*- und *N*-Phosphate), beispielsweise die HPr-Kinase (Phosphohistidin) im Phosphoenolpyruvat-abhängigen Phosphotransferasesystem (PTS) [9, 10].
- C) Die Phosphorylierung von Aspartat, Glutamat und auch Histidin ist beteiligt an der sensorischen Reizleitung bei der bakteriellen Chemotaxis [11, 12].

Die Seitenketten-Phosphorylierungen lassen sich gemäß ihrer chemischen Struktur in vier Gruppen unterteilen: (1.) *O*-Phosphate (*O*-Phosphomonoester) werden gebildet durch die Phosphorylierung der Hydroxyaminosäuren wie Serin, Threonin, Tyrosin und die erst durch posttranslationale Hydroxylierung entstehenden Hydroxyaminosäuren Hydroxylysin und Hydroxyprolin. (2.) *N*-Phosphate (Phos-

phoamidate) entstehen durch die Phosphorylierung der Aminogruppen von Arginin, Lysin und Histidin. (3.) Acylphosphate bilden sich durch die Phosphorylierung von Asparaginsäure (Aspartat) und Glutaminsäure (Glutamat). (4.) *S*-Phosphate (*S*-Phosphothioester) entstehen durch die Phosphorylierung von Cystein. Die chemische Stabilität der Phosphoaminosäuren wird zusammenfassend in Tabelle 1 gezeigt.

Tab. 1: Chemische Stabilität von Phosphaminosäuren [13].

|                      | Stabilität in |        |              |         |
|----------------------|---------------|--------|--------------|---------|
|                      | Säure         | Alkali | Hydroxylamin | Pyridin |
| <b>O-Phosphate</b>   |               |        |              |         |
| Phosphoserin         | +             | -      | +            | +       |
| Phosphothreonin      | +             | +/-    | +            | +       |
| Phosphotyrosin       | +             | +      | +            | +       |
| <b>N-Phosphate</b>   |               |        |              |         |
| Phosphoarginin       | -             | -      | -            | -       |
| Phosphohistidin      | -             | +      | -            | -       |
| Phospholysin         | -             | +      | -            | -       |
| <b>Acylphosphate</b> |               |        |              |         |
| Phosphoaspartat      | -             | -      | -            | -       |
| Phosphoglutamat      | -             | -      | -            | -       |
| <b>S-Phosphate</b>   |               |        |              |         |
| Phosphocystein       | (+)           | +      | +            | +       |

Alle *O*-Phosphate, einschließlich Phosphohydroxylysin [14] und Phosphohydroxyprolin [15], sind unter sauren Bedingungen stabil. Die *O*-Phosphate sind ebenfalls stabil in Hydroxylamin und Pyridin. Im Gegensatz dazu sind die *N*-Phosphate, mit Ausnahme von Phosphoarginin, stabil unter basischen Bedingungen. Die Acylphosphate sind aufgrund ihrer hohen Reaktivität instabil in Säure, Alkali, Hydroxylamin und Pyridin. Dagegen ist Phosphocystein unter vergleichbaren Bedingungen stabiler, bzw. unter sauren Bedingungen weniger stabil.

## 1.5 Posttranslationale Modifikationen am Prolin und Hydroxyprolin

### 1.5.1 Hydroxylierung von Prolin

Hydroxy-L-prolin wird nicht über die üblichen Mechanismen während der Proteinbiosynthese an den Ribosomen in eine Polypeptidkette eingebaut, vielmehr wird proteinogenes Prolin posttranslational durch Hydroxylasen sequenzspezifisch hydroxyliert [16]. Sowohl 4-Hydroxy-L-prolin als auch 3-Hydroxy-L-prolin wurden bisher in verschiedenen Typen des Kollagens nachgewiesen. Darüber hinaus ist 4-Hydroxy-L-prolin in diversen weiteren Proteinen enthalten.

Prolyl-Hydroxylasen sind sequenzspezifische Enzyme mit zweiwertigem Eisen im aktiven Zentrum, die proteinogene Prolyl-Reste in Gegenwart von Ascorbinsäure,  $\alpha$ -Ketoglutar Säure und molekularem Sauerstoff oxidieren. Die Hydroxylierungsreaktion ist sehr spezifisch - freies Prolin wird dabei nicht umgesetzt. Erst Peptide mit mindestens drei Aminosäureresten werden hydroxyliert. Man unterscheidet nach der Spezifität zwischen Prolyl-4-Hydroxylasen, die Prolin am C-4-Atom hydroxylieren, und Prolyl-3-Hydroxylasen, die Prolin am C-3-Atom hydroxylieren (Abb. 1).

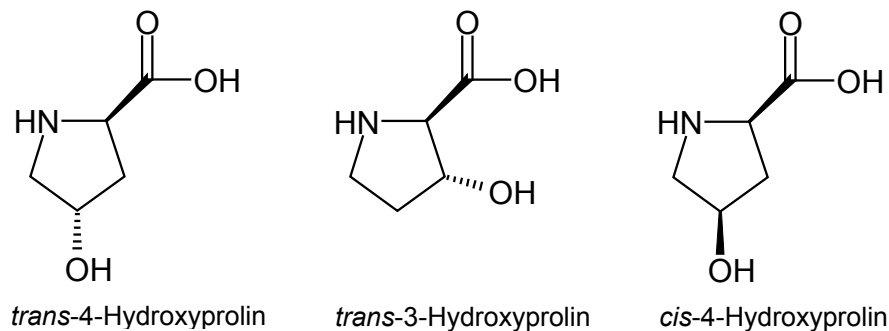


Abb. 1: Konstitutionsisomere des Hydroxyprolins

Prolyl-4-Hydroxylase hydroxyliert Prolin nur, wenn es aminoterminal von Glycin lokalisiert ist (Pro-Gly-Motiv), während Prolyl-3-Hydroxylase das Prolin nur dann hydroxyliert, wenn es sich auf der Carboxylseite eines Glycins befindet (Gly-Pro-Motiv). Die häufiger vorkommende Variante ist das 4-Hydroxyprolin. Das Vorkommen von 3-Hydroxyprolin macht beispielsweise in Kollagenen nur

bis zu zwei Prozent aus. Darüber hinaus ist das Vorkommen von 3-Hydroxyprolin bisher nur wenig untersucht. Die bisher bekannten Hydroxylgruppen werden in der *trans*-Konfiguration am Prolinring eingebaut. Es ist nicht bekannt, ob die Hydroxylgruppen am Prolinring auch in der epimeren *cis*-Konfiguration vorkommen (Abb. 1).

### 1.5.2 Glykosylierung von Hydroxyprolin

Hydroxyprolin (Hyp) wird ebenso wie Hydroxylysin (Hyl) in vielen Proteinen enzymatisch glykosyliert. So sind in Kollagen bis zu 70% der Hyl-Reste mit Galactose und Glycosyl-Galactose an der Hydroxylgruppe modifiziert [17]. In den Extensinen (HRGPs, Hydroxyprolin-reiche Glykoproteine) der pflanzlichen Zellwand beträgt der Kohlenhydratanteil etwa 50% der Proteinmasse [18-20]. Der größte Teil dieser Kohlenhydrate sind an Hyp gebundene mono-, di-, tri-(1→2)- $\beta$ -verknüpfte Arabinosen [18]. Weiterhin ist in dem ubiquitär in Eukaryoten vorkommenden SKP1-Protein (F-box bindendes Protein), eine quantitativ glykosylierte Hyp-Position bekannt [21]. Diese Beispiele belegen die weitreichende Verbreitung posttranslationaler Glykosylierungen an den Hydroxylgruppen von Hyp und Hyl. Die Rolle der Glykosylierungen ist noch nicht in allen Fällen aufgeklärt, doch scheinen sowohl funktionale als auch strukturelle Aspekte von Bedeutung zu sein.

In Analogie zu der von Hart aufgestellten Hypothese, daß die Glykosylierung (*O*-GlcNAcylierung) von Serin- und Threonin-Resten reziprok zur *O*-Phosphorylierung vorkommen kann [22], ist ein ähnlicher Mechanismus auch für Hyp- und Hyl-Reste vorstellbar.

### 1.5.3 Phosphorylierung von Hydroxyprolin

*O*-phosphoryliertes Hydroxylysin wurde erstmals 1948 in Gewebeextrakten (Muskeln, Herz, Niere und Gehirn) aus Kälbern nachgewiesen [23, 24]. Mehr als 20 Jahre später konnte gezeigt werden, daß *O*-Phosphohydroxylysin ein früher Metabolit des 5-Hydroxylysin-Abbaus in der Rattenleber ist [25, 26]. Die Phos-

phorylierung wird durch eine GTP-abhängige Hydroxylysin-Kinase katalysiert [27]. Obwohl diese Phosphorylierung ausschließlich auf Ebene der freien Aminosäure erfolgt, zeigte dies erstmalig, daß Hydroxylysin *in vivo* phosphoryliert wird. Darauf aufbauend konnte in einer 1985 veröffentlichten Arbeit die *O*-Phosphorylierung proteinogener Hydroxylysin-Reste in Kollagen nachgewiesen werden [14]. Nach Zugabe von [ $^{32}\text{P}$ ]-Orthophosphat zum Nährmedium einer Zellkultur (Zellen glatter Muskulatur aus der Aorta) wurde das radioaktiv markierte *O*-Phosphohydroxylysin durch Phosphoaminosäureanalyse in Kollagen identifiziert. Damit ließ sich die Existenz von *O*-Phosphohydroxylysin als proteinogener Bestandteil des Kollagens nachweisen, doch erlaubte die angewandte Methodik nicht die Bestimmung der Sequenzposition der modifizierten Aminosäure. Trotz der vielversprechenden Ansätze wurden die Arbeiten nicht fortgeführt und sowohl die Sequenzposition eines Phosphohydroxylysin-Restes als auch die physiologische Bedeutung der Phosphorylierung proteinogener Hydroxyprolin-Reste sind weiterhin unbekannt.

In der Literatur gibt es bisher keine Hinweise, daß gezielt nach proteinogenem *O*-Phosphohydroxyprolin gesucht wurde. Obwohl die Bedeutung proteinogener *O*-Phosphate von Serin, Threonin und Tyrosin seit langem bekannt ist, und später auch einmalig das Vorkommen von Phosphohydroxylysin (s.o.) nachgewiesen wurde, sind keine Ansätze bekannt, die den Nachweis von Phosphohydroxyprolin zum Ziel hatten. Selbst bei der oben beschriebenen Arbeit über Phosphohydroxylysin wurde Phosphohydroxyprolin in die Analysen nicht mit einbezogen, obwohl die Autoren in der Diskussion ausdrücklich auf die hohe Wahrscheinlichkeit einer *O*-Phosphorylierung von Hydroxyprolin hinwiesen.

Drei Publikationen [15, 28, 29] weisen indirekt auf die Möglichkeit einer Phosphorylierung von Hydroxyprolin in Proteinen hin. Alle drei Arbeiten untersuchten die enzymatische *O*-Phosphorylierung der Seitenketten verschiedener Hydroxyaminosäuren in synthetischen Peptiden. Zu den untersuchten Sequenzen zählte jeweils auch ein Peptid mit Hydroxyprolin. Dabei zeigte sich stets, daß die Hydroxyprolin-Reste als mögliches Substrat für die untersuchten Kinasen in Frage kommen. Da in keiner der Arbeiten Hydroxyprolin-spezifische Kinasen untersucht wurden, waren die ermittelten kinetischen Konstanten niedrig im Vergleich zu denen der anderen untersuchten Hydroxyaminosäuren Serin und Threonin,

doch zeigte sich die prinzipielle Möglichkeit der enzymatischen Phosphorylierung von Hydroxyprolin in Peptiden. Eine der Arbeiten berücksichtigte bei der Untersuchung die Konfiguration der Hydroxylgruppe am Prolinring. Im Ergebnis zeigte sich, daß die enzymatische Phosphorylierung am Hydroxyprolin-Rest mit *trans*-4-Konfiguration möglich war, nicht aber am Hydroxyprolin-Rest mit *cis*-4-Konfiguration [28].

Der bislang einzige direkte Hinweis auf proteinogenes Phosphohydroxyprolin findet sich als Nebenaspekt in einer Arbeit über die Biosilikatbildung in Kieselalgen [30]. Bei der Biosilikatbildung spielt das polyanionische natSil-2-Protein eine wichtige Rolle. Bei der Aminosäureanalyse von natSil-2 fand sich neben Hydroxyprolin auch ein Hinweis auf Phosphohydroxyprolin. Die dabei zum Einsatz gekommene Methode der Aminosäureanalyse mittels Anionenaustausch-Chromatographie Fmoc-derivatisierter Aminosäuren erlaubt keine Bestimmung der Sequenzposition der detektierten Aminosäuren. Auch die relative Menge des gefundenen Phosphohydroxyprolins bleibt unklar.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß eine *O*-Phosphorylierung an proteinogenem Hydroxyprolin möglich ist und in Analogie zu allen anderen untersuchten proteinogenen Hydroxyaminosäuren, einschließlich Hydroxylysin, mit hoher Wahrscheinlichkeit ubiquitär in Proteinen vorkommt.

## **1.6 Untersuchte Phosphohydroxyprolin-haltige Proteine**

### **1.6.1 Kollagene**

Kollagen kommt bei allen mehrzelligen Lebewesen aus dem Tierreich (Metazoa) vor und ist das häufigste Protein bei den Wirbeltieren (Vertebrata). Es ist ausschließlich in der Extrazellulärmatrix des Bindegewebes lokalisiert und bildet dort übergeordnete Struktureinheiten wie Fibrillen und Netze, welche die mechanische Stabilität des Gewebes gewährleisten und Ankerpunkte für andere Moleküle der Extrazellulärmatrix darstellen.

Ein einzelnes Kollagenmolekül besteht immer aus drei Polypeptidketten annähernd gleicher Größe. Es gibt sowohl homotrimere als auch heterotrimere Kolla-

gentypen. So sind bei den Säugetieren über 20 Kollagentypen bekannt, die gewebespezifisch im Organismus vorkommen. Allen Kollagentypen gemeinsam ist das Vorhandensein mehr oder weniger großer Bereiche, die als Tripelhelix organisiert sind. Die Tripelhelix ist das für die mechanischen Eigenschaften des Kollagens verantwortliche Strukturelement. Die Größe der beteiligten Polypeptidketten ist abhängig vom Kollagentyp. Bei den fibrillären Kollagentypen besteht jede der drei Polypeptidketten aus bis zu 1000 Aminosäureresten; die funktionelle Einheit der drei Polypeptidketten hat ein Molekulargewicht von 285 kDa.

Die Bildung einer Tripelhelix setzt eine spezifische Aminosäurezusammensetzung der beteiligten Polypeptidketten voraus: Glycin stellt fast ein Drittel der Reste; weitere 15-30% entfallen auf Prolin und Hydroxyprolin. Hydroxylysin kommt in geringeren Anteilen ebenfalls im Kollagen vor. Die Aminosäuresequenz des Kollagens ist außerdem bemerkenswert regelmäßig. Ein Großteil der Sequenz besteht aus einer monotonen Abfolge des Aminosäuretripeptids Gly-Xaa-Yaa, wobei häufig an Position Xaa ein Prolin und an Position Yaa ein Hydroxyprolin in der Kette vorkommt. Die repetitive Sequenz mit dem hohen Anteil an Iminosäuren ist Voraussetzung für die tripelhelikale Struktur des Kollagens.

Im Innern der Tripelhelix ist wenig Platz, und die einzige Aminosäure, die in den Innenraum paßt, ist Glycin. Da eine Helixwindung aus drei Aminosäuren besteht, muß also jeder dritte Rest ein Glycin sein. Die Seitenketten der beiden nachfolgenden Aminosäuren sind in der Helix nach außen orientiert, wo entsprechend Platz für die sterisch voluminösen Ringe von Prolin und Hydroxyprolin vorhanden ist. Die drei Einzelstränge sind über Wasserstoffbrücken miteinander verknüpft. Wasserstoffdonor ist dabei jeweils die NH-Gruppe eines Glycins, Wasserstoffakzeptor die CO-Gruppe einer Aminosäure einer benachbarten Polypeptidkette. Die Tripelhelix wird zusätzlich durch die sterische Abstoßung der Pyrrolidinringe des Prolins und Hydroxyprolins in der Peripherie der Tripelhelix stabilisiert [31].

Das Vorkommen von Glycin an jeder dritten Position in der Sequenz der Polypeptidkette ist für die Selbstorganisation und Stabilität einer Tripelhelix unabdingbar. Allein die durch einen einzelnen Basenaustausch verursachte Mutation, bei der ein Glycin durch ein Cystein ersetzt wird (Osteogenesis imperfecta), kann zu einer

solchen Instabilität der Tripelhelix führen, daß sich die Mutation letal auswirkt [32]. Die Positionen Xaa und Yaa können neben Prolin und Hydroxyprolin prinzipiell auch von jeder anderen Aminosäure besetzt werden, doch kommen einige Aminosäuren nie oder nur äußerst selten in einer Tripelhelix vor (z. B. Cys, Trp, Tyr) [33]. Zudem sind rechnerisch zwar 400 verschiedene Aminosäuretripeptide des Typs Gly-Xaa-Yaa möglich, doch kommen davon nur ca. 25 Tripeptide mit einer Häufigkeit von mehr als 1% vor. Einige Aminosäuren kommen bevorzugt in der Position Xaa oder Yaa vor. Beispielsweise finden sich Phe, Leu und Glu für gewöhnlich in Position Xaa, während Arg und Lys oft in Position Yaa zu finden sind. Es wird angenommen, daß hinderliche sterische oder günstige elektrostatische Interaktionen für die asymmetrische Verteilung der Aminosäuren verantwortlich sind [34-36].

Prolin ist die häufigste Aminosäure in Position Xaa. In Position Yaa wird Prolin für gewöhnlich posttranslational zu Hyp modifiziert, noch bevor die drei Polypeptidketten zur Tripelhelix angeordnet werden. Wesentlich seltener wird Prolin auch in Position Yaa posttranslational hydroxyliert. Warum die Hydroxylierung in den Kollagenpolypeptidketten auf ganz bestimmte Prolinreste beschränkt bleibt (insbesondere *trans*-3-Hyp in Position Yaa), ist nach wie vor weitestgehend ungeklärt.

Die Aminosäuren in den Positionen Xaa und Yaa sind sowohl für die Stabilität der Tripelhelix mit verantwortlich als auch für die Spezifizierung der intermolekularen Wechselwirkungen von Bedeutung. So ist ein Mindestmaß an Iminosäuren in den Positionen Xaa und Yaa für die Ausbildung einer stabilen Tripelhelix erforderlich. Der Iminosäureanteil im Kollagen bestimmt dabei dessen thermische Stabilität. Je höher der Iminosäureanteil, desto stabiler ist die Helix. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der thermischen Stabilität des Kollagens und der Körpertemperatur einer Art, aus der das Kollagen stammt. So haben Säugetiere einen Iminosäureanteil von rund 23%, einige Kaltwasserfische beispielsweise aber nur einen Iminosäureanteil von rund 15%. Darüber hinaus hat der Grad der Hydroxylierung einen entscheidenden Einfluß auf die thermischen Stabilität des Kollagens. Je höher der Anteil an Hydroxyprolin, desto größer ist die thermische Stabilität [37].

Innerhalb einer Art variiert der Anteil des überwiegend vorkommenden *trans*-4-Hydroxyprolins nur wenig zwischen den verschiedenen Typen des Kollagens, während große Unterschiede zwischen den Kollagentypen auftreten, was den Anteil des viel selteneren *trans*-3-Hydroxyprolins und auch den Anteil von Hydroxylysin betrifft. Der Anteil von *trans*-3-Hyp und Hydroxylysin innerhalb eines Gewebes kann darüber hinaus in Abhängigkeit vom physiologischen oder pathologischen Zustand des Gewebes variieren [38].

Die heute bekannten Kollagensequenzen der verschiedenen Kollagentypen beruhen in weiten Teilen auf Untersuchungen der entsprechenden Gensequenzen. Da aber auf dieser Ebene der Analyse posttranslationale Modifikationen nicht aufgeklärt werden können, sind viele Sequenzpositionen von Hydroxyprolin nach wie vor unbekannt.

### 1.6.2 Kristalline

Die Augenlinse ist ein Gewebe, dessen Hauptcharakteristika Transparenz und ein hoher refraktärer Index ( $RI = 1,40$  beim Menschen) sind. Um diese Eigenschaften zu gewährleisten, ist die Augenlinse nicht innerviert und avascular. Darüber hinaus ist eine besondere Zellarchitektur der Linsenfaserzellen erforderlich. Neben der symmetrischen Anordnung der hexagonalen Linsenfaserzellen ist die chemische Zusammensetzung entscheidend für ihre Transparenz. Die Linsenfaserzellen zeichnen sich bei nur geringem Wassergehalt (65%) durch eine ungewöhnlich hohe Proteinkonzentration (bis zu 450 mg/ml) aus.

Die Augenlinse ist ektodermalen Ursprungs. Durch Induktion verdickt sich das über der Augenblase liegende Ektoderm, bildet die Linsengrube aus und schnürt sich später als Linsenbläschen ab. Während der Linsenentwicklung elongieren die posterioren Zellen des Linsenbläschens, füllen es vollständig aus und differenzieren zu primären Linsenfaserzellen, die den Linsenkern bilden. Die anterioren Zellen des Linsenbläschens bleiben als einschichtiges Epithel bestehen. Durch Proliferation der Epithelzellen werden permanente Zellen in die Äquatorregion der Linse geschoben, wo die Epithelzellen in sekundäre Faserzellen umgewandelt werden. Sie werden von den nachfolgenden Faserzellen zur Mitte gedrängt und lagern

sich konzentrisch um den ursprünglichen Linsenkern an. Dieses appositionelle Wachstum ohne Abstoßung alter Epithel- oder Faserzellen wird während der gesamten Lebensspanne beibehalten, wenn auch später in stark verlangsamten Tempo, so daß die Augenlinse ständig an Größe und Gewicht zunimmt. Während der Elongation der Epithelzellen zu Faserzellen kommt es zur starken Expression der Kristalline. Nach dem Wachstumsende der Faserzellen werden die Zellkerne und die zytoplasmatischen Organellen vollständig abgebaut, so daß in den ausdifferenzierten Faserzellen deshalb keine Proteinsynthese mehr möglich ist. Auch existiert kein Proteinaustausch zwischen den Zellen. Die in den Faserzellen während der Embryonalphase des Organismus gebildeten Proteine müssen also ein Leben lang erhalten bleiben und ihre Funktionalität bewahren [39]. Die dominierenden Proteine der Linsenfasern sind die Kristalline, die dort bis zu 90% der löslichen Proteine ausmachen. Bei allen Kristallinen wurden extensive posttranslationale Modifikationen beobachtet. Dazu zählen u.a. Trunkierung, Methylierung, Acetylierung, Glykosylierung, Oxidationen und Phosphorylierungen [40].

Tab. 2: Kristalline der Augenlinse.

| ubiquitäre Kristalline |                        |                      | taxonspezifische Kristalline                  |            |
|------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------------------------------|------------|
| $\alpha$<br>(20 kDa)   | $\beta$<br>(22-33 kDa) | $\gamma$<br>(20 kDa) | $\delta$<br>(40 kDa)<br>(Reptilien und Vögel) | andere     |
| $\alpha A$             | $\beta A_1$            | $\gamma A$           |                                               | $\epsilon$ |
| $\alpha B$             | $\beta A_2$            | $\gamma B$           | $\delta_1$                                    | $\zeta$    |
| (Nagetiere)            | $\beta A_3$            | $\gamma C$           | $\delta_2$                                    | $\eta$     |
| $\alpha A^{ins}$       | $\beta A_4$            | $\gamma D$           |                                               | $\lambda$  |
|                        | $\beta B_1$            | $\gamma E$           |                                               | $\mu$      |
|                        | $\beta B_2$            | $\gamma F$           |                                               | $\rho$     |
|                        | $\beta B_3$            | $\gamma S$           |                                               | $\tau$     |
|                        |                        |                      |                                               | $\iota$    |
|                        |                        |                      |                                               | $\Omega$   |
|                        |                        |                      |                                               | $\sigma$   |
|                        |                        |                      |                                               | $\jmath$   |

Bei den ubiquitär vorkommenden Kristallinen unterscheidet man drei Proteinfamilien:  $\alpha$ -Kristalline,  $\beta$ -Kristalline und  $\gamma$ -Kristalline. Aufgrund ihres gemeinsa-

men evolutionären Ursprungs und ihrer hohen Sequenzhomologie werden  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kristalline auch zur  $\beta/\gamma$ -Superfamilie zusammengefaßt. Daneben gibt es eine Reihe taxonspezifischer Kristalline, die meist noch eine enzymatische Funktion aufweisen. So werden beispielsweise bei Vögeln statt der  $\gamma$ -Kristalline  $\delta$ -Kristalline exprimiert. Kristalline wurden auch bei Avertebraten gefunden: S-Kristallin in Tintenfischen, J-Kristallin in Quallen (Tab. 2).

Die dominierende Proteinfraction der Augenlinse sind die  $\alpha$ -Kristalline, sie machen bis zu 50% des gesamten löslichen Proteins aus. Es gibt zwei  $\alpha$ -Kristalline:  $\alpha A$  und  $\alpha B$ .  $\alpha A$  hat eine Länge von 173 Aminosäuren und  $\alpha B$  ist 175 Aminosäuren lang. Die beiden Proteine existieren in einem Mengenverhältnis von drei ( $\alpha A$ ) zu eins ( $\alpha B$ ). Bei Nagetieren kommt eine Splicingvariante des  $\alpha A$ -Kristallins vor, in deren Sequenz ein 23 Aminosäuren langes Insert zwischen den Aminosäuren 63 und 64 der  $\alpha A$ -Kristallin-Sequenz integriert ist.  $\alpha A^{\text{ins}}$ -Kristallin ist somit 196 Aminosäuren lang.

Die beiden  $\alpha$ -Kristalline,  $\alpha A$  und  $\alpha B$ , sind zu 55% sequenzhomolog. Außerdem besteht eine starke Interspezies-Homologie unter den Vertebraten ( $> 95\%$ ). Die  $\alpha$ -Kristalline sind phylogenetisch mit den kleinen Hitzeschockproteinen (*small heat-shock proteins*, sHsps) verwandt. Beide Proteinfamilien werden deshalb auch in der  $\alpha$ -Kristallin-sHsp-Superfamilie zusammengefaßt, denen die sogenannte  $\alpha$ -Kristallin-Domäne gemeinsam ist. Sie umfaßt die 80 Aminosäuren des C-Terminus der  $\alpha$ -Kristalline. Neben der Rolle als Strukturprotein der Augenlinse übt  $\alpha$ -Kristallin eine wichtige chaperonähnliche Funktion aus. In der Augenlinse bilden  $\alpha A$ - und  $\alpha B$ -Kristallin heterogene Aggregate von 300-1000 kDa. Diese  $\alpha$ -Kristallin-Aggregate werden von 15-50 Untereinheiten gebildet. Die einzelne  $\alpha$ -Kristallin-Polypeptidkette hat ein Molekulargewicht von ca. 20 kDa. Monomeres  $\alpha$ -Kristallin oder Oligomere niederen Molekulargewichts sind aber nicht bekannt [41].  $\alpha$ -Kristalline kommen auch außerhalb der Augenlinse vor. Als Strukturproteine spielen sie in diesen Geweben aber keine Rolle. Vermutlich dominiert hier die chaperonähnliche Funktion.

Kristalline der  $\beta$ - und der  $\gamma$ -Familie werden wegen ihrer großen Homologie zur  $\beta/\gamma$ -Kristallin-Superfamilie zusammengefaßt. Gemeinsames Strukturmerkmal dieser Proteinfamilie ist der sogenannte *Griechische Schlüssel*. Sowohl  $\beta$ - als auch

$\gamma$ -Kristalline bilden jeweils vier *Griechische Schlüssel*, die wiederum jeweils aus vier antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern bestehen. Die *Griechischen Schlüssel* sind dabei paarweise in zwei Domänen des Proteins angeordnet. Diese Struktur ermöglicht eine besonders dichte Packung der Proteine. Die  $\beta/\gamma$ -Kristalline gelten als die eigentlichen Strukturproteine der Augenlinse, hingegen dem  $\alpha$ -Kristallin vor allem eine Chaperonfunktion zugesprochen wird.

Bei den  $\gamma$ -Kristallinen dominiert intramolekulare Domänenpaarung. Sie kommen ausschließlich als Monomere mit einem Molekulargewicht von rund 20 kDa vor. Im Gegensatz dazu interagieren die Domänen der  $\beta$ -Kristalline intermolekular und bilden Multimere (Dimere bis Oktamere), wobei sowohl Homomere als auch Heteromere der sieben Subklassen (Tab. 2) möglich sind [42].

## 1.7 Identifizierung von Phosphoamino­säuren

Erst die Identifizierung posttranslationaler Modifikationen macht die Charakterisierung eines Proteins vollständig, da mit der entsprechenden Modifikation oft entscheidende Struktur-, und Funktionsänderungen einhergehen. Die Modifikationen der Proteine, wie auch die Phosphorylierung, erfolgen nach der Translation, lassen sich folglich nicht aus der Sequenz der DNA ableiten. Die Aufklärung der Proteinphosphorylierung kann deshalb nur auf Ebene der Proteine selbst erfolgen. Neben der Bestimmung der Art der phosphorylierten Aminosäure im Protein ist die Bestimmung der Position in der Aminosäuresequenz von grundlegendem Interesse.

Die weitverbreiteten analytischen Methoden zur Identifikation von Phosphorylierungen, wie die radioaktive Markierung von Phosphoproteinen mit  $^{32}\text{P}$  und die sich daran anschließende chromatographische oder elektrophoretische Identifizierung [43] der markierten Proteine, haben ebenso wie der immunologische Nachweis mittels spezifischer Antikörper [44] den Nachteil, daß nur die Phosphoproteine als solche identifiziert werden, aber keine Aussagen über die Phosphorylierungsstellen gemacht werden können. Die Phosphorylierung der Aminosäureseitenketten kann auch durch  $^{31}\text{P}$ -NMR [45] bestimmt werden, doch wird für dieses Verfahren eine relativ viel größere Probenmenge benötigt und die Aminosäurese-

quenz muß bekannt sein, um die Position der Phosphorylierung ermitteln zu können.

Eine chemische Besonderheit der *O*-Phosphate ist ihre Stabilität gegenüber Säuren. Da die Phosphoesterbindung unter sauren Bedingungen stabiler ist als die Peptidbindung des Peptidrückgrates können Proteine durch partielle saure Hydrolyse in ihre Aminosäurebestandteile zerlegt werden, ohne daß dabei die Aminosäuren degradiert werden. Die so freigesetzten Phosphoaminosäuren können dann nach einer Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)–Derivatisierung mittels Anionenaustausch-HPLC mit isokratischer Elution voneinander getrennt werden [46]. Eine weitere Methode zur Identifizierung von *O*-Phosphaten ist die Derivatisierung mit Dabsylchlorid und anschließender Trennung durch Kapillarelektrophorese [47]. Beiden Verfahren gemein ist die Derivatisierung der Aminosäuren vor ihrer Auftrennung. Eine alternative Trenntechnik, die ohne vorhergehende Derivatisierung auskommt, ist die zweidimensionale Trennung der Phosphoaminosäuren auf einem Dünnschichtträgersystem mittels Chromatographie oder Elektrophorese [48]. Die Detektion erfolgt durch Ninhydrin-Färbung oder im Falle von  $^{32}\text{P}$ -markierten Phosphoaminosäuren durch autoradiographische Verfahren.

Eine sehr sensitive Methode zur Identifizierung von Phosphoaminosäuren in Proteinen ist der Nachweis mittels spezifischer Antikörper nach elektrophoretischer Trennung der Proteine und anschließendem Western Blot. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, daß das Protein zur Detektion der Phosphoaminosäuren weder hydrolysiert werden muß, noch die Phosphoaminosäuren derivatisiert werden müssen. Die Entwicklung spezifischer Antikörper gegen Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin wurden schon von verschiedenen Autoren beschrieben. Monoklonale Antikörper gegen Phosphotyrosin können ausreichend spezifisch sein, um eine einzelne phosphorylierte Tyrosinseitenkette unabhängig von ihrer Sequenzumgebung zu erkennen. Im Gegensatz dazu konnten bisher keine Antikörper gegen Phosphoserin oder Phosphothreonin generiert werden, die die jeweilige phosphorylierte Seitenkette unabhängig von ihrer Sequenzumgebung erkennen, da die phosphorylierte Seitenkette von Serin und Threonin zu klein ist (im Gegensatz zur Phosphotyrosinseitenkette). Damit einher geht auch stets eine gewisse Kreuzreaktivität der Antikörper gegen die jeweils andere Phosphoaminosäure (Antikörper gegen Phosphoserin erkennen auch Phosphothreonin und um-

gekehrt). Die Antikörper gegen Phosphoserin oder Phosphothreonin sind i.A. dennoch in der Lage, spezifisch Phosphoproteine von dem entsprechenden unphosphorylierten Protein zu unterscheiden [49]. Bisher wurden weder polyklonale noch monoklonale Antikörper gegen phosphoryliertes Hydroxylysin oder Hydroxyprolin beschrieben.

Die bis hierhin geschilderten Techniken können nur ein erster Schritt zur Identifizierung einer Phosphorylierungsstelle sein, da mit ihnen nur die Phosphorylierung als solche, nicht aber die Position der Phosphorylierungsstelle charakterisiert werden kann. Hierfür ist die Identifizierung der Aminosäuresequenz, sprich die Primärstruktur des Phosphoproteins, und damit die genaue Lokalisation der phosphorylierten Aminosäure unerlässlich.

Vor der Etablierung massenspektrometrischer Verfahren für die Analyse großer Biomoleküle wie Proteine, war die Edman-Sequenzierung die einzig mögliche Methode zur Lokalisierung phosphorylierter Aminosäuren. Bei der Edman-Sequenzierung ist es möglich, nach Derivatisierung der Phosphoaminosäuren, zwischen Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin zu unterscheiden und so die Position der Phosphorylierung zu bestimmen [47]. Doch ist diese Methode weitaus weniger empfindlich als die normale Edman-Sequenzierung. Auch fehlen bisher gänzlich kompatible Verfahren zur Derivatisierung von Phosphohydroxylysin und Phosphohydroxyprolin. Ein wesentlich sensitiveres Verfahren, bei dem eine Fluorophor-Markierung der Phosphoaminosäure zum Einsatz kommt, ist nur zum Nachweis von Phosphoserin geeignet [50].

Da alle posttranslationalen Modifikationen eine Änderung des Molekulargewichts zur Folge haben, bieten sich massenspektrometrische Methoden zur ihrer Identifizierung und Charakterisierung an [51]. Massenspektrometrische Methoden, besonders MALDI-MS und ESI-MS, wurden schon vielfach zur Strukturaufklärung von Phosphopeptiden verwendet. Mit ihrer Hilfe können Phosphoproteine sequenziert und die genaue Lokalisation der Phosphorylierungsstelle identifiziert werden. MALDI-MS und besonders ESI-MS werden in Kapitel 2.8 zum besseren Verständnis detailliert erklärt.

## 1.8 Ziel der Arbeit

Posttranslationale Modifikationen sind oftmals von entscheidender Bedeutung für die Struktur und Funktion von Proteinen. Anders als die Aminosäuresequenz der Proteine lassen sich die posttranslationalen Modifikationen aber nicht aus der genetischen Sequenz ableiten. Die Identifizierung der posttranslationalen Modifikation ist deshalb nur am Protein selbst möglich. Eine häufige Variante der posttranslationalen Modifikation ist die *O*-Phosphorylierung von Proteinen an den Seitenketten bestimmter Aminosäuren. Konservativen Schätzungen zufolge werden mehr als ein Drittel aller Proteine reversibel phosphoryliert. Die Identifizierung von Phosphoaminosäuren in Proteinen ist daher von großer Bedeutung für die Proteinanalytik.

Neben der *O*-Phosphorylierung der im Genom codierten Hydroxyaminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin sind *O*-Phosphorylierungen an zwei weiteren Hydroxyaminosäuren möglich, die selbst erst durch eine posttranslationale Modifikation, durch Hydroxylierung, entstehen: Hydroxylysin und Hydroxyprolin. Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin wurden vielfach in Proteinen identifiziert und darüber hinaus auch ihre Position in der Aminosäuresequenz beschrieben [51-53]. Die Möglichkeit der Phosphorylierung von Hydroxylysin und Hydroxyprolin ist hingegen weitgehend unbekannt und kaum untersucht. So findet sich für das Vorkommen von Phosphohydroxylysin und Phosphohydroxyprolin in nativen Proteinen bisher jeweils nur ein erster Hinweis in der Literatur [14, 30]. Die Identifizierung einer Sequenzposition steht nach wie vor aus.

Trotz der in der Literatur vorkommenden Hinweise auf Phosphohydroxylysin und Phosphohydroxyprolin gibt es bis heute keine grundlegenden Arbeiten über die strukturelle und funktionelle Bedeutung dieser posttranslationalen Modifikationen in Hydroxylysin- und Hydroxyprolin-haltigen Proteinen. Übergeordnetes Ziel muß daher die Identifizierung und genaue Lokalisierung entsprechender Sequenzpositionen sein. Erst die vergleichende Untersuchung mehrerer solcher Sequenzpositionen erlaubt Rückschlüsse auf die strukturellen und funktionellen Aspekte dieser posttranslationalen Modifikationen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Identifizierung und Charakterisierung von Phosphohydroxyprolin in der Sequenz eines nativen Proteins. Da bisher keine, bzw. kaum Kenntnisse über Phosphohydroxyprolin als proteinogener Aminosäure vorlagen, sollten zunächst die methodisch-analytischen Grundlagen geschaffen werden.

Dazu sollte zunächst die Synthese Phosphohydroxyprolin-haltiger Peptide etabliert werden, um diese synthetischen Peptide als Referenzstandard für die Analyse nativen Materials verwenden zu können. Danach sollten dann mit globalen Methoden wie der Phosphoaminosäureanalyse und dem Nachweis von Phosphohydroxyprolin mittels spezifischer Antikörper Proteine identifiziert werden, die das doppelt modifizierte Derivat des Prolins enthalten, um im darauffolgenden Schritt mittels massenspektrometrischer Methoden die genaue Sequenzposition des Phos-phohydroxyprolins zu identifizieren.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien und Kollagene

Die verwendeten Chemikalien wurden von Bachem, Merck und Sigma-Aldrich bezogen und entsprachen dem höchsten Reinheitsgrad. Die Fmoc-Aminosäurederivate und Polymerharze wurden bei Nova Biochem, die Reagenzien und Lösungsmittel für die Peptidsynthese bei Applied Biosystems und die Lösungsmittel für die RP-HPLC bei Biosolve erworben.

Kollagene des Typs I, II, III, V, VI, VII, VIII wurden von Sigma-Aldrich bezogen. Die Klassifizierung der Kollagene richtet sich nach der Nomenklatur von Bornstein und Traub [54].

### 2.2 Radioaktive Markierung

#### 2.2.1 Zellkultur

Für die *in vitro*-Kultivierung einer Zelllinie glatter Muskelzellen aus der Aorta wurden Zellen embryonaler Ratten (A-10-Zellen, DSMZ) verwendet. Das Kulturmedium war ein basal, minimal essentielles Medium, supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum und L-Ascorbinsäure (50 µg/ml). Die Zellen wurden in Kulturflaschen mit 80 cm<sup>2</sup> Kulturfläche bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre gehalten, bis zu einer Zelldichte, kurz vor Erreichen eines konfluenten Monolayers.

#### 2.2.2 [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat-Einbau

Die fast konfluenten Zellen wurden mit phosphatfreiem Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer (pH 7,4) mit 20 mM Hepes gewaschen und dann in dem gleichen Puffer, supplementiert mit L-Ascorbinsäure (100 µg/ml), wieder in Kultur genommen. Dieser Puffer enthielt pro Kulturflasche 0,6 mCi [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat (Hartmann Analytic) in 5,5 nMol Orthophosphat. Die Inkubation erfolgte für 6 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre.

## 2.3 Phosphoaminosäureanalyse

### 2.3.1 Saure Hydrolyse

Für die Aminosäureanalyse mittels 2D-Dünnschichtelektrophorese wurden die Proteine einer partiellen sauren Hydrolyse unterworfen. Die Hydrolyse erfolgte in 6 M HCL bei 110°C für 2 Stunden. Nach der Hydrolyse wurden die Proben in einer Speedvac getrocknet. Die Proben wurden in H<sub>2</sub>O resuspendiert und auf eine Sephadex G-50-Säule (Amersham Biosciences) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit H<sub>2</sub>O. Die Fraktionen wurden in einer Speedvac getrocknet.

### 2.3.2 Zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese (2D-DE)

Auftrennung und Detektion der Aminosäuren nach saurer Hydrolyse erfolgte durch 2D-DE auf Dünnschichtcellulose-Platten (0,1 mm Cellulose MN 300, 20 x 20 cm, Macherey-Nagel). Dazu wurde das radioaktive Hydrolysat in H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Lösung enthielt außerdem je 0,5 µg/µl Phosphohydroxylysin, Phosphoserin, Phosphothreonin, Phosphohydroxyprolin und Phosphotyrosin als Referenzmarker. Dieses Gemisch wurde in 10 Aliquots (je 1 µl) auf die DC-Platte aufgetragen. Die horizontale Elektrophorese wurde in zwei Dimensionen in einer Multiphor II-Apparatur (Amersham Biosciences) bei konstanten 4°C durchgeführt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in der ersten Dimension für 20 Minuten bei 1500 V in Elektrophoresepuffer 1 (pH 1,9; 0,58 M Ameisensäure, 1,36 M Essigsäure) und nach Drehen der DC-Platte um 90° in der zweiten Dimension für 16 Minuten bei 1300 V in Elektrophoresepuffer 2 (pH 3,5; 0,87 M Essigsäure, 0,5% Pyridin (v/v), 0,5 mM EDTA). Nach der Elektrophorese wurden die Aminosäuren durch Besprühen der DC-Platte mit 0,25% Ninhydrin in Aceton und anschließender Erhitzung auf 80°C visualisiert. Radioaktiv markierte Aminosäuren wurden durch <sup>32</sup>P-Phospho-Imaging detektiert. <sup>32</sup>P ist ein β-Strahler mit hoher Strahlungsenergie (E<sub>max</sub>=1,71 MeV) und läßt sich deshalb mit hoher Sensitivität autoradiographisch nachweisen.

## 2.4 Synthesen

### 2.4.1 Synthese von Phosphohydroxyprolin und Phosphohydroxylysin

Für die vergleichende 2D-DE der Phosphoaminosäuren wurden alle in Frage kommenden Aminosäuren und deren Phosphoderivate benötigt. Die Phosphoderivate der Aminosäuren Hydroxyprolin und Hydroxylysin waren kommerziell nicht erhältlich und wurden deshalb nach dem Protokoll von Eckhard *et al.* [55] synthetisiert. Zur Synthese von *O*-Phosphohydroxyprolin wurden 10 mMol Phosphoroxychlorid tropfenweise zu einer Lösung von 5 mMol Hydroxyprolin in 25 mMol Trimethylphosphat gegeben (bei der Synthese von *O*-Phosphohydroxylysin wurde äquimolar verfahren). Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und die entstandene viskose Flüssigkeit mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Diese stark saure Lösung wurde auf eine Dowex 50X8 (H<sup>+</sup>-Form) Kationenaustauscher-Säule (20 x 50 mm) aufgebracht und die Säule mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Elution erfolgte mit 1 M Ammoniumhydroxid. Das Eluat wurde im Rotationsverdampfer getrocknet und anschließend in H<sub>2</sub>O resuspendiert. Diese Lösung wurde auf pH 7 eingestellt und auf eine Dowex 1X8 (Cl<sup>-</sup>-Form) Anionenaustauscher-Säule (20 x 50 mm) aufgebracht und die Säule mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Elution erfolgte diesmal mit 1 M Essigsäure. Das Eluat wurde wiederum im Rotationsverdampfer getrocknet und danach in H<sub>2</sub>O resuspendiert. Abschließend wurde das Syntheseprodukt massenspektrometrisch charakterisiert.

### 2.4.2 Synthese von Fmoc-Hydroxyprolin

Von den zur Festphasenpeptidsynthese benötigten 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Derivaten der Hydroxyprolinisomeren war nur Fmoc-*trans*-4-Hydroxyprolin kommerziell verfügbar und wurde von Nova Biochem bezogen. Die Fmoc-Derivate von *trans*-3-Hydroxyprolin und *cis*-4-Hydroxyprolin waren kommerziell nicht erhältlich und wurden deshalb gemäß dem Protokoll von Paquet [56] synthetisiert (Abb. 2.1).

Je 8,9 mMol (1 g) des L-Hydroxyprolinisomers wurden in 20 ml einer wässrigen 10% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung gelöst, auf 0°C gekühlt und tropfenweise einer eiskal-

ten Lösung von 8,9 mMol (3 g) 9-Fluorenylmethoxycarbonylsuccinimid (Fmoc-OSu) in 20 ml DMF zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, mit 250 ml H<sub>2</sub>O verdünnt und zweimal mit Ethylether extrahiert (zur besseren Phasentrennung wurde NaCl zugesetzt). Die organischen Phasen wurden verworfen. Die vereinten wässrigen Phasen wurden auf 0°C gekühlt und mit konz. HCL auf pH 2 angesäuert. Dann wurde viermal mit je 25 ml Ethylacetat extrahiert und die wässrige Phase verworfen. Die vereinten organischen Phasen wurden mit 1 N HCL (2x) und H<sub>2</sub>O (2x) gewaschen und im Rotationsverdampfer auf rund 50 ml eingengt. Nach Zugabe von 50 ml Hexan wurde das Produkt bei -20°C über Nacht auskristallisiert. Die Kontrolle der Reaktion erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (Laufmittel: DCM/MeOH/AcOH (90:5:5)) mit Fmoc-*trans*-4-Hydroxyprolin als Referenz. Darüber hinaus wurden die Syntheseprodukte massenspektrometrisch charakterisiert.

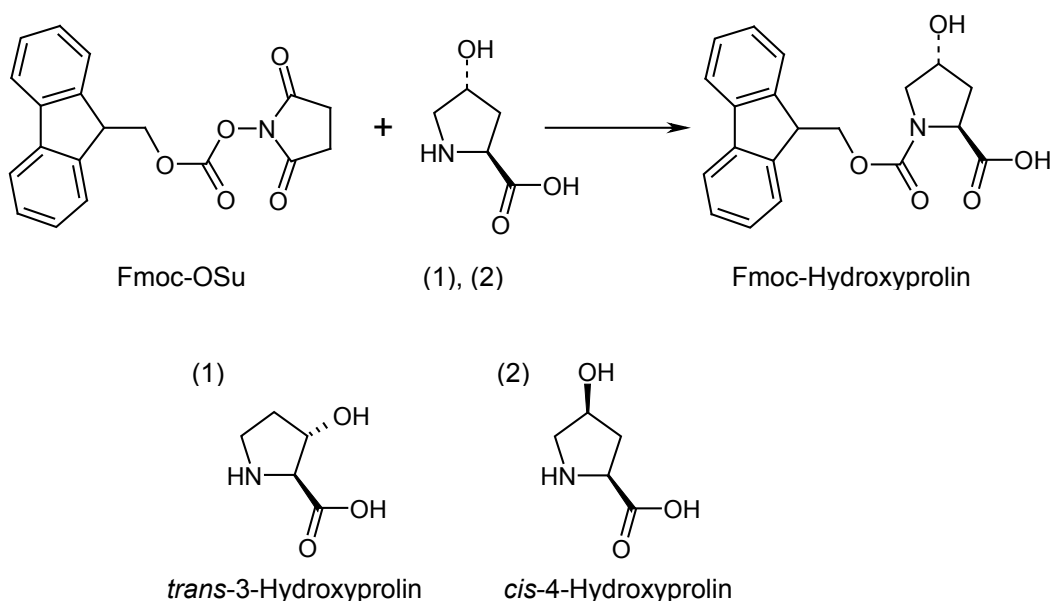


Abb. 2.1: Schema der Fmoc-Hydroxyprolin-Synthese

### 2.4.3 Peptidsynthese

Bei der chemischen Synthese von Peptiden werden Aminosäuren durch die Bildung von Säureamiden durch Kondensationsreaktion sukzessiv miteinander verknüpft. Da jede Aminosäure sowohl eine  $\text{NH}_2$ -Gruppe wie auch eine  $\text{COOH}$ -Gruppe besitzt, müssen für einen gerichteten Ablauf der Kondensationsreaktion sowohl die *N*-terminale Aminogruppe des ersten Reaktionspartners, dessen Carboxygruppe in Reaktion treten soll, als auch die *C*-terminale Carboxygruppe des anderen Reaktionspartners, dessen Aminokomponente reagieren soll, durch reversibel spaltbare Schutzgruppen blockiert werden. Um unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden, müssen darüber hinaus die reaktiven Seitenketten der sogenannten trifunktionellen Aminosäuren (Lys, Arg, His, Glu, Asp, Ser, Thr, Tyr, Cys) in reversibler Form geschützt werden. Andererseits muß für eine effiziente Amidbildung die reaktionsträge, freie Carboxygruppe des einen Reaktionspartners in ein reaktionsfähiges, aktiviertes Derivat umgewandelt werden.

Bei der von Merrifield 1963 eingeführten Methode der Festphasenpeptidsynthese [57] wird das Peptid an einem polymeren Träger sequentiell vom *C*- zum *N*-Terminus aufgebaut (Abb. 2.2). Im ersten Schritt wird die *C*-terminale Aminosäure des zu synthetisierenden Peptides mit ihrer Carboxygruppe über eine Ankergruppierung (Linker) mit dem polymeren Träger (Harz) verbunden. Der Linker ermöglicht die Abspaltung des Peptides vom Harz nach beendeter Synthese unter spezifischen Bedingungen. Die in der Sequenz folgende, *N*-terminal geschützte Aminosäure wird am Carboxyterminus mittels Kopplungsreagenzien aktiviert (z.B. als Ester) und dann an das freie Aminoende der Peptidkette gekoppelt. Nach der Abspaltung der Aminoschutzgruppe folgt die Kopplung der nächsten *N*-terminal geschützten Aminosäure. Dieser Zyklus von Kopplung und Abspaltung wird solange wiederholt, bis das Peptid die gewünschte Länge erreicht hat. Nachdem sämtliche Kopplungen durchgeführt wurden, wird das Peptid vom Harz abgespalten, d.h. die kovalente Bindung zwischen *C*-terminaler Aminosäure und der Ankergruppe des polymeren Trägers wird getrennt, wobei je nach Linker das Peptid als Säure oder als Amid entsteht. Dabei werden in gewünschter Nebenreaktion die Seitenkettenschutzgruppen direkt mit abgespalten.

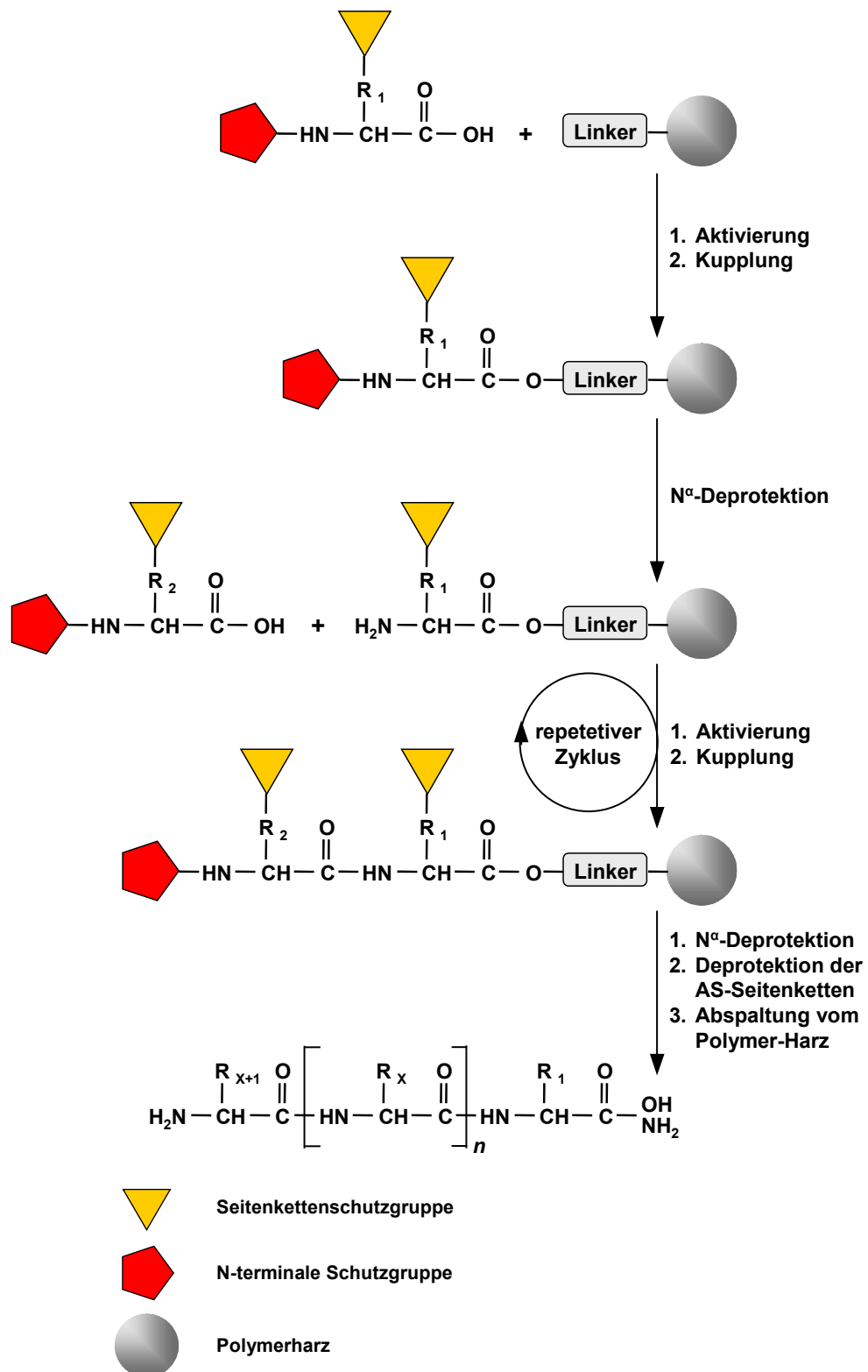


Abb. 2.2: Schema der Festphasenpeptidsynthese

Bei der Wahl der Schutzgruppen ist es entscheidend, daß im Laufe der Synthese die *N*-terminale Schutzgruppe in jedem Zyklus wieder entfernt werden muß, ohne daß es zur vorzeitigen Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen kommt. Es ist also eine anders geartete Labilität von Seitenketten- und terminalen Schutzgruppen erforderlich. Dabei müssen alle am Ende der Synthese noch vorhandenen Schutzgruppen so labil sein, daß sie abgespalten werden können, ohne daß das Peptid dadurch beschädigt wird. Dieses Problem wird heute meistens mit der Fmoc- oder mit der Boc-Strategie gelöst.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Fmoc-Strategie schützt die  $\alpha$ -Aminogruppe mit dem basenlabilen Fluorenylmethoxycarbonyl-Rest (Fmoc). Die Fmoc-Schutzgruppe ist über eine Urethanbindung mit der  $\alpha$ -Aminogruppe verknüpft, die durch Piperidin unter  $\beta$ -Eliminierung gespalten wird. Die Basenlabilität der Fmoc-Gruppe beruht auf der Acidität des H-Atoms am C<sub>9</sub>-Atom des Fluorensystems, d.h. auf der relativen Stärke des dabei entstehenden Anions. Zum Seitenkettenschutz werden hingegen säurelabile Gruppen eingesetzt, ebenso wie für die Ankergruppierung zum Polymerharz.

Nach der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe am *N*-Terminus der Peptidkette muß der Carboxykohlenstoff der zu koppelnden Aminosäure durch elektronenziehende Gruppen aktiviert werden, um den nucleophilen Angriff der elektronenreichen Aminogruppe zu ermöglichen. Zur Bildung einer Peptidbindung wird für gewöhnlich die zu koppelnde Aminosäure im 10fachen Überschuß zugegeben und mit den Aktivierungsreagenzien 2-(H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU)/1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) aktiviert. HBTU ist ein Kopplungsreagenz mit hoher Reaktivität. Die Bildung der aktiven Aminosäure verläuft basenkatalysiert mit *N,N*-Diisopropylethylamin (DIEA). Es entsteht dabei zunächst ein *O*-acetyliertes Isoharnstoffderivat. Gleichzeitig wird ein HOBt-Anion freigesetzt. Das Zwischenprodukt kann nun direkt mit der freien Aminokomponente eine Peptidbindung eingehen oder mit dem freigesetzten HOBt einen Aktivester bilden. Neben dem Peptid tritt als Produkt *N,N'*-Tetramethylharnstoff auf. Durch den Basenzusatz erhöht sich die Nucleophilie der Aminokomponente. Das HOBt verringert dabei die Tendenz zur Racemisierung.

Die Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen sowie die Abspaltung vom Harz nach der Synthese erfolgt in einem Schritt durch konzentrierte Trifluoressigsäure (TFA) unter Zusatz von 5-20% Scavenger. Hierbei handelt es sich um Kationen- und Radikalfänger, die unerwünschte Nebenreaktionen unterdrücken: elektronenreiche Aromaten (Thioanisol, *m*-Kresol) und Thiole (Ethandithiol) zum Abfangen der Abspaltprodukte.

Nach erfolgter Synthese wurden die Peptide mit TFA vom Polymerharz abgespalten, in Diethylether gefällt, der Diethylether verdunstet und die Peptide in H<sub>2</sub>O/0,1% TFA resuspendiert. Vor der weiteren Verwendung wurden alle synthetischen Peptide mittels RP-HPLC über eine semipräparative C<sub>18</sub>-Säule gereinigt und im Anschluß daran massenspektrometrisch charakterisiert.

Die Peptide wurden mit einem Peptidsynthesizer 433A (PE Applied Biosystems) im 0,1 Mol-Maßstab mittels der oben beschriebenen Fmoc-Strategie synthetisiert. Zur Synthese der Peptide, in deren Sequenz während der Synthese ein Hydroxyprolin mit ungeschützter Seitenkette (zur späteren Phosphorylierung) eingebaut wurde, kamen wegen der hierbei erforderlichen geringeren Reaktivität die Aktivierungsreagenzien *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC)/1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) zum Einsatz.

#### 2.4.4 Peptidphosphorylierung

Es gibt grundsätzlich zwei Möglichkeiten zur Synthese von Phosphopeptiden. Der erste Ansatz verwendet phosphorylierte Fmoc-Aminosäuren, die während der Peptidsynthese wie gewöhnliche Fmoc-Aminosäuren gekoppelt werden. Beim zweiten Ansatz, der globalen Phosphorylierung, erfolgt die Phosphorylierung postsynthetisch an den ungeschützten Hydroxylgruppen der Aminosäureseitenkette (Abb. 2.3). Das Peptid bleibt dabei bis zum Abschluß der Phosphorylierung an das Polymerharz gekoppelt. Vorteil der globalen Phosphorylierung gegenüber dem direkten Einbau der phosphorylierten Aminosäuren ist die Möglichkeit, in einem Syntheseansatz das unphosphorylierte Peptid zu synthetisieren und einen Teil dieses Peptides nach Bedarf zu phosphorylieren.

Bei der globalen Phosphorylierung erfolgt die Phosphorylierung in einer zweistufigen Reaktion, bei der die ungeschützten Hydroxylgruppen der zu phosphorylierenden Aminosäureseitenkette zunächst mit Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit/Tetrazol phosphityliert und das intermediäre Phosphit nachfolgend mit *tert*.-Butylhydroperoxid oxidiert wird. Nach der Phosphorylierung werden die Peptide mit TFA vom Harz abgespalten. In dem sauren Milieu werden dabei ebenfalls die beiden Benzylschutzgruppen am Phosphatrest abgespalten.

Zur Phosphitylierung wurde das Peptidharz mit dem 25fachen molaren Überschuß Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit und dem 50fachen molaren Überschuß Tetrazol über Nacht geschüttelt und anschließend gründlich mit Acetonitril und Methanol gewaschen. Zur Oxidierung wurde das Peptidharz mit dem 50fachen molaren Überschuß *tert*.-Butylhydroperoxid eine Stunde geschüttelt und anschließend gründlich mit Dimethylformamid (DMF) und Dichlormethan (DCM) gewaschen.

TFA-Abspaltung, Diethylether-Fällung und RP-HPLC-Reinigung der phosphorylierten Peptide erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei den unphosphorylierten Peptiden. Die Phosphopeptide wurden zwecks Überprüfung der Phosphorylierung ebenfalls massenspektrometrisch charakterisiert.

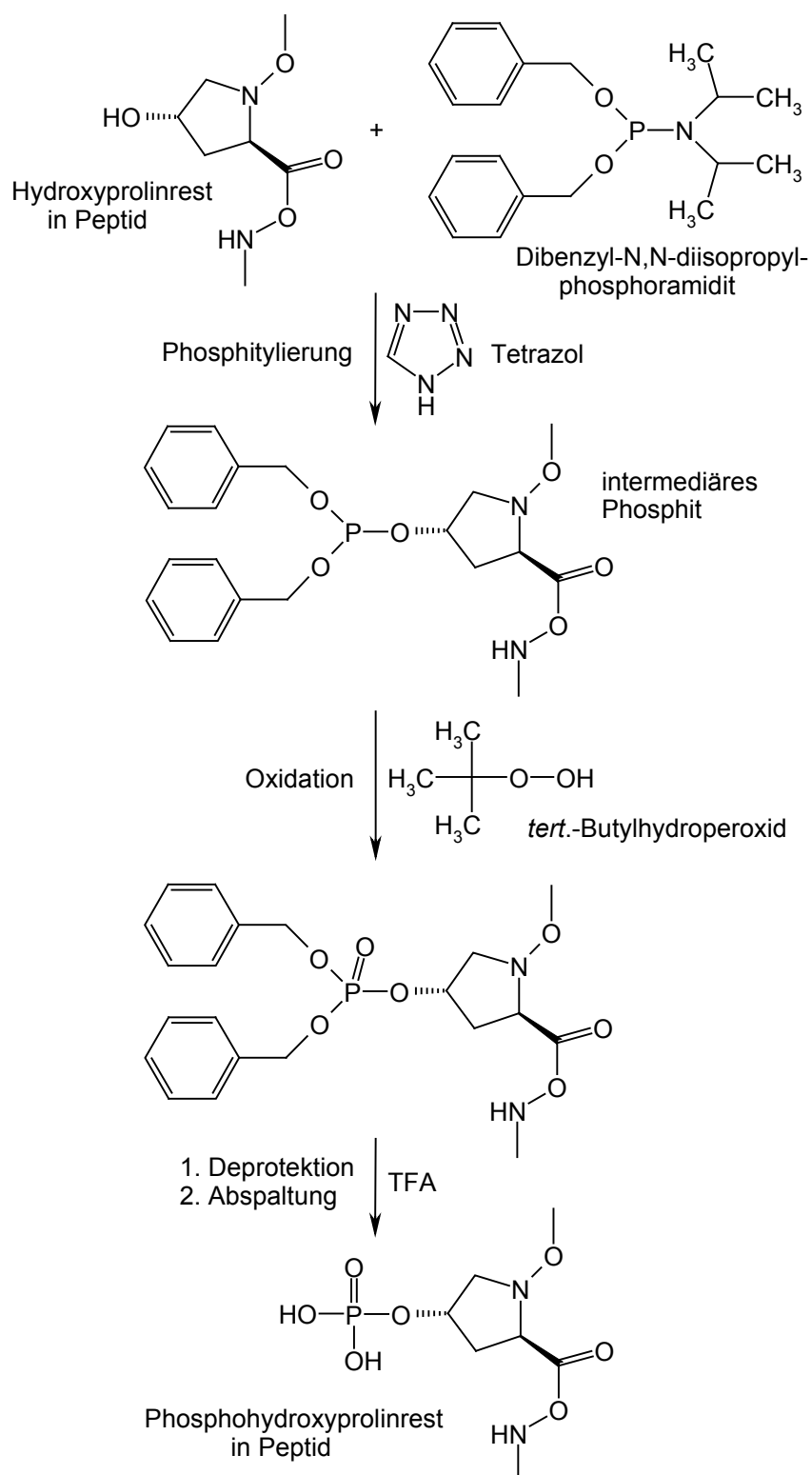


Abb. 2.3: Schema der globalen Phosphorylierung.

## 2.5 Proteinaufbereitung

### 2.5.1 Proteinpräparation

Die Proteine wurden aus dem Gewebe adulter Wistar-Ratten (Zentrale Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) präpariert. Dazu wurden den Tieren unmittelbar nach ihrer Tötung Augen, Herz und Aorta entnommen. Die Tötung der Tiere erfolgte gemäß der geltenden Tierschutzgesetze. Die weitere Präparation erfolgte auf Eis, bzw. bei 4°C, unter besonderer Berücksichtigung des Erhaltes posttranslationaler Phosphorylierungen der zu isolierenden Proteine. Augen, Herz und Aorta wurden getrennt aufgearbeitet. Nach gründlichem Waschen mit eiskaltem TBS-Puffer wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und in einem Mörser mit einem Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben. Nach Resuspension des pulverisierten Gewebes in kaltem Homogenisierungspuffer erfolgte die Homogenisierung mittels Douncer-Homogenisator. Der Homogenisierungspuffer bestand aus: 50 mM Tris-HCL, pH 7,4; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40; 0,25% Natriumdeoxycholat; 1 mM Natriumorthovanadat; 1 mM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure); 1 mM Benzamidin; 10 µM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid); 1 mM DTT (Dithiothreitol).

Das Homogenisat wurde zur Entfernung der unlöslichen Zelltrümmer für 30 Minuten mit 28.000 g zentrifugiert. Die löslichen Proteine des Überstands wurden durch eine saure Aceton-Fällung isoliert. Dazu wurde der Überstand mit TCA und Aceton gemischt (1:1:9). Nach einer Stunde bei -20°C wurden die ausgefällten Proteine mit 10.000 g abzentrifugiert und das Pellet dreimal mit eiskaltem 80% Aceton gewaschen. Die Trocknung des Proteinpellets erfolgte an der Luft, die Lagerung der Proteine bei -80°C. Zur weiteren Isolierung wurden die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt.

### 2.5.2 Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli [58] angewandt. Dabei dienen Chloridionen im Puffersystem als Leitonen und Glycinionen als Folgeionen. Ein Sammelgel (Tris-Cl-Puffer pH 6,8; 4% Acrylamid) überschichtet ein Trenngel (Tris-Cl-Puffer pH 8,8; 8-18% Acrylamid). Der Elektrophoresepuffer (pH 8,3) enthält Tris-Glycin. Alle Puffer enthalten 0,1% SDS. Polymerisiert wird durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS)/Tetramethylethyldiamin (TEMED). Bei der Elektrophorese von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen unter den durch SDS hervorgerufenen, denaturierenden Bedingungen [59, 60] ergibt sich ein lineares Verhältnis zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und der relativen Mobilität der Proteine. Diese Linearität ist aber für eine gegebene Gelkonzentration limitiert. Die kombinierte Anwendung von SDS und Gelgradienten [61, 62] bietet den Vorteil der Genauigkeit der Molekulargewichtsabschätzung und Reproduzierbarkeit über einen breiteren Bereich (Molekulargewichte zwischen 13 kDa und 1000 kDa bei 3-30%igen Gelen).

Es wurden 1 mm starke Trenngele als 8-18%ige Gradientengele gegossen. Nach der Polymerisation wurde das Trenngel mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte in einer Hoefer SE 600 Elektrophoreseapparatur (16x16x0,1cm) bei Spannungen zwischen 60 und 120 Volt, bis die gewünschte Trennstrecke erreicht war. Als Marker diente der Low-Range-Molekulargewichtsstandard von Bio-Rad (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low-Range, Bio-Rad, Hercules CA). Zur Visualisierung der Proteinbanden wurden die Gele mit Coomassie-Blau nach dem Protokoll von Kang [63] quantitativ gefärbt. Diese reversible Coomassie-Färbung zeichnet sich durch ihre hohe Sensitivität (vergleichbar mit Silberfärbung) und gute Kompatibilität zur massenspektrometrischen Analyse der Proteine aus.

### 2.5.3 Western Blot

Beim Western Blot wurden die Proteine aus einem SDS-Gel elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran mit 0,45 µm Porendurchmesser (Immobilon-P, Millipore)

übertragen. Die Proteinübertragung erfolgte nach der semi-dry-Methode nach Khyse-Anderson [64] in einer Blotkammer von Nova Blot (Amersham Pharmacia). Die Proteine auf der PVDF-Membran wurden mit Ponceau-Rot reversibel visualisiert, bzw. erfolgte durch immunologischen Nachweis.

#### **2.5.4 Dot Blot**

Der Dot Blot bietet die Möglichkeit, auch Peptide auf einer Membran zu immobilisieren. Hierfür wurde Nitrocellulosemembran mit einem Porendurchmesser von  $0,2\ \mu\text{m}$  (Trans-Blot, Bio-Rad) verwendet. Die Protein- oder Peptidlösung (maximal  $2\ \mu\text{l}$ /Auftrag) wurde mit einer  $2\ \mu\text{l}$ -Pipette aufgetragen. Bei Probenvolumina von mehr als  $2\ \mu\text{l}$  wurde mehrfach mit zwischenzeitlichen Trockenphasen pipetiert. Die Detektion erfolgte durch immunologischen Nachweis.

#### **2.5.5 Enzymatische Proteinspaltung**

Um sequenzierbare Peptide für die massenspektrometrische Analyse zu erhalten, wurden die denaturierten Proteine mit Trypsin (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega) gespalten. Die Endoprotease Trypsin spaltet Proteine an der carboxyterminalen Seite von Lysin- und Arginin. Arginin-Prolin- bzw. Lysin-Prolin-Bindungen sind trypsinresistent. Auch greift Trypsin Peptidbindungen zwischen einer basischen Aminosäure (Lysin, Arginin) und einer sauren Aminosäure (Glutamat, Aspartat) nur langsam an. Nach Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und die Proteine mit 5% Trypsin (bezogen auf die Proteinmasse) in einem 25 mM Ammonium-Hydrogencarbonat Puffer (pH 8,0) bei  $37^\circ\text{C}$  über Nacht gespalten.

#### **2.5.6 Enzymatische Dephosphorylierung**

Zur unspezifischen Proteindephosphorylierung wurde Alkalische Phosphatase (AP) von Sigma-Aldrich verwendet. Die Dephosphorylierungsreaktion von 1 mg Protein erfolgte mit 10 Units AP in 1 ml 50 mM Tris-HCL-Puffer (pH 9,8) mit

1 mM  $\text{MgCl}_2$  für 2 Stunden bei 37°C. Zum Stoppen der Reaktion wurde für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, um das Enzym zu zerstören. Die Serin/Threonin-spezifische Proteindephosphorylierung wurde mit der Proteinphosphatase 2B Calcineurin von Sigma-Aldrich durchgeführt. Je 1 mg Protein wurde mit 50 Units Calcineurin in 1 ml 50 mM Tris-HCL-Puffer (pH 7,4) mit 10 mM  $\text{CaCl}_2$  für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde die Probe anschließend für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, um das Enzym zu inaktivieren.

## 2.6 Phosphohydroxyprolin-spezifische Antikörper

### 2.6.1 Herstellung von polyklonalen Antikörpern

Peptide mit einem Molekulargewicht unter 5 kD sind selten immunogen. Um die Bildung von Antikörpern auszulösen, müssen die Haptene daher an einen Träger gekoppelt werden. Die zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern vorgesehenen Peptide wurden mit einem N-terminalen Cystein synthetisiert und an Maleimid-aktiviertes KLH (keyhole limpet hemocyanin) gekoppelt. KLH ist wegen seines hohen Molekulargewichts ( $4,5 \times 10^5$  bis  $1,3 \times 10^7$  kDa) und seiner starken Immunogenität das am weitesten verbreitete Trägerprotein.

Zur Konjugation wurden jeweils 2 mg ( $\sim 1 \mu\text{Mol}$ ) der synthetischen Peptide mit 2 mg ( $\sim 0,7 \mu\text{Mol}$  der Maleimid-Gruppen) Maleimid-aktiviertem KLH für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde zur Absättigung noch aktiver Maleimid-Gruppen freies Cystein im 10fachen molaren Überschuß zugesetzt. Nicht konjugiertes Peptid und freies Cystein wurden anschließend durch Dialyse entfernt. Das dialysierte Konjugat wurde gefriergetrocknet und in PBS resuspendiert (1 mg/ml).

Die Injektionen der Antigene, Haltung der Tiere, Blutentnahme und die Gewinnung des Immunserums wurde von SEQLAB, Göttingen, durchgeführt. Vor der Injektion wurde das Konjugat mit Freund's Adjuvans im Volumenverhältnis 1:1 gemischt und mittels Ultraschall eine stabile Emulsion hergestellt. Freund's Adjuvans (FA) besteht aus nichtabbaubarem Mineralöl, das als Depot für das Antigen dient, und enthält darüber hinaus abgetötete *Mycobacteriae tuberculosis*, welche

die Immunreaktion verstärken. Mehrere Injektionen (je 800 µl Antigen/Injektion) wurden zu beiden Seiten der Rückgratlinie eines Kaninchens subkutan injiziert. Nach ca. 3 Wochen wurde geboostet, d.h. Antigen in FA injiziert; ebenso 6 Wochen und 9 Wochen nach der Erstinjektion. 12 Wochen nach der Erstinjektion erfolgte die Blutentnahme (~25 ml) aus der Ohrvene des Kaninchens. Zur Gewinnung des Immunsersums wurde das Blutplasma von den zellulären Bestandteilen des Blutes getrennt und das Serum bei –80°C gelagert.

Nur ein kleiner Teil der Serumproteine sind Antikörper. Das Immunsorum wurde deshalb säulenchromatographisch über Protein-A-Sepharose aufgetrennt. Protein A aus *S. aureus* bindet Antikörper reversibel über ihre Fc-Domäne (1 Mol Protein A bindet 2 Mol IgG). Die Bindung der Antikörper an Protein A erfolgte bei alkalischem pH (pH 8-9), die Elution bei pH 2-3. Die Antikörper wurden in TBS (pH 7,4) mit 1% BSA bei –80°C gelagert.

### 2.6.2 Immunfärbung

Der spezifische Antigennachweis auf Blotmembranen erfolgte durch Immunfärbung. Nach Blockierung ungesättigter Proteinbindungsstellen auf der Membran durch Magermilchpulver (5%) in TBSN wurde die Membran für zwei Stunden mit dem gegen das Antigen gerichteten, polyklonalen Antikörper (Erstantikörper) inkubiert. Mit dem gegen den Erstantikörper gerichteten, Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper (monoclonal anti-rabbit IgG ( $\gamma$ -chain specific), Sigma) wurde eine Stunde inkubiert. Die Detektion der Antikörperbindung erfolgte durch Peroxidase-vermittelte Umsetzung von Diaminobenzidin zum farbigen Endprodukt. Alternativ wurde zur Detektion das ECL-System (enhanced chemiluminescence) verwendet. Bei der Peroxidase-katalysierten Oxidation von Luminol wird das bei der Chemilumineszenz freigesetzte Licht zur Schwärzung eines Films genutzt.

### 2.6.3 ELISA

Beim ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) wurden je 50 µl Antigen (Peptidlösung variabler Konzentration) in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte

(Maxisorp, Nunc) pipettiert. Die Adsorption des Antigens erfolgte durch Eintrocknung der Lösung über Nacht. Ungesättigte Proteinbindungsstellen wurden mit 4% BSA in TBSN blockiert. Der gegen das Antigen gerichtete, polyklonale Antikörper (Erstantikörper) wurde zwei Stunden inkubiert, der gegen den Erstantikörper gerichtete, Peroxidase-konjugierte Zweitantikörper (monoclonal anti-rabbit IgG ( $\gamma$ -chain specific), Sigma) wurde eine Stunde inkubiert. Die Detektion der Antikörperbindung erfolgte durch Peroxidase-vermittelten Substratumsatz (Tetramethylbenzidin) zum blauen Endprodukt. Die Reaktion wurde mit 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gestoppt (Farbumschlag nach gelb). Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 450 nm im Photometer (Sunrise, Tecan).

## **2.7 Chromatographische Methoden**

### **2.7.1 Reversed-Phase-Chromatographie (HPLC)**

Zur Reinigung der synthetischen Peptiden wurde eine Beckmann-HPLC (System Gold) mit einer semipräparativen Säule (Jupiter 5 $\mu$  C<sub>18</sub> 300A, 250x10 mm, Phenomenex) verwendet. Die Detektion erfolgte bei 230 nm. Es wurde ein Gradient von 5-65% Acetonitril, 0,1% TFA mit einer Steigung von 1,5% pro Minute über 40 Minuten mit einer Flußrate von 2 ml/min gefahren. Die gesammelten Fraktionen wurden gefriertrocknet.

### **2.7.2 Micro-Reversed-Phase-Chromatographie**

Zur Entsalzung und Anreicherung von Peptiden nach der Trypsin-Spaltung und vor der MS-Analyse wurden ZipTip C<sub>18</sub>-Pipettenspitzen (Millipore) verwendet. Das C<sub>18</sub>-Material in der Pipettenspitze ermöglicht die Reversed-Phase-Chromatographie im Miniaturmaßstab (< 10  $\mu$ l). Die Bindungs- und Waschlösung enthielt 4% Methanol und 1% Ameisensäure. Die Elution erfolgte mit 60% Methanol und 1% Ameisensäure. Gegebenfalls wurde eine Stufen-Elution mit sukzessiv erhöhtem Methanolgehalt durchgeführt, d.h. neben der Ameisensäure enthielt die Elutionslösung 10%, bzw. 20%, 30%, 40%, 50% oder 60% Methanol.

## 2.8 Massenspektrometrie

### 2.8.1 Massenspektrometrische Analyse

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Sie hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung für die Analyse von Proteinen und Peptiden gewonnen. Dies ist vor allem auf die Entwicklung sogenannter weicher Ionisierungsmethoden wie ESI (*electrospray ionisation*) und MALDI (*matrix assisted laser desorption/ionisation*) zurückzuführen.

### 2.8.2. MALDI-MS

Die MALDI-Ionisierungsmethode wurde Ende der 80er Jahre von Hillenkamp und Karas entwickelt [65]. Der Analyt wird mit einem 1000fachen molaren Überschuss an Matrix gemischt und auf einem Probenträger kristallisiert. Das eingestrahelte Licht eines Laserimpulses wird von der Matrix absorbiert und führt zu einer starken lokalen Aufheizung der Kristalle. Die schnelle Aufheizung führt zur Sublimation der Matrixkristalle und des Analyten in die Gasphase. Der typische Geräteaufbau besteht aus einer Kopplung der MALDI Ionenquelle mit einem Flugzeit-Massenspektrometer (time-of-flight MS, TOF-MS). Der kurze Laserpuls, der die Desorption des Analyten bewirkt, dient gleichzeitig als Startsignal für die Flugzeitmessung. Die durch den Laserpuls erzeugten Ionen werden in der Quelle beschleunigt und durchlaufen nach dem Verlassen der Quelle eine feldfreie Flugstrecke von etwa 1-2 Metern. Hier separieren sie sich aufgrund ihres Masse/Ladungs-( $m/z$ )-Verhältnisses. Das Verhältnis von Masse zu Ladung ist dem Quadrat der Flugzeit proportional, d.h. die schwereren Ionen mit einem großen  $m/z$ -Verhältnis erreichen den Detektor zu einem späteren Zeitpunkt als die leichteren Ionen.

Die MALDI-MS Messungen wurden mit einem an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf entwickelten MALDI-TOF-MS durchgeführt. Als Matrix wurde stets Dihydroxybenzoesäure (DHB) verwendet.

### 2.8.3 ESI-MS

Bei der ESI-Massenspektrometrie werden die Analyten nicht durch Einbau in eine verdampfbare Matrix, sondern durch Versprühen der Analytlösung in feinste Tröpfchen in die Gasphase überführt [66]. Zugesezte Säure unterstützt die Ionisierung der Analyten, organische Lösungsmittel werden zur Verbesserung der Sprayeigenschaften eingesetzt. Die von Mann und Wilm entwickelte Nanospray-ESI-Methode erlaubt die Untersuchung geringster Probenvolumina (minimal 0,5 µl) bei gleichzeitiger erhöhter Empfindlichkeit [67].

Der Begriff Elektrospray beschreibt die Dispersion einer Flüssigkeit in sehr viele kleine geladene Tröpfchen mit Hilfe eines elektrostatischen Feldes. Die Desolvatisierung, d.h. der Transfer von Ionen aus der Lösung in die Gasphase, ist ein endergonischer Prozeß. Im elektrischen Feld werden die Ionen bei Atmosphärendruck in die Gasphase transferiert. Dieser Prozeß läßt sich formal in vier Schritte unterteilen: (1) Die Bildung von kleinen geladenen Tröpfchen aus Elektrolyten. (2) Der kontinuierliche Lösungsmittelverlust dieser Tröpfchen durch Verdampfen, wobei die Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche zunimmt. (3) Wiederholter spontaner Zerfall der Tröpfchen in Mikrotröpfchen (Coulomb-Explosionen). (4) Die Desolvatisierung der Analytmoleküle beim Transfer in das MS.

Die Elektrospray-Ionisation findet bei Atmosphärendruck statt, die anschließende Analyse der freien Ionen jedoch im Hochvakuum (ca.  $10^{-5}$  torr). Dies erfordert eine spezielle Schnittstelle (Interface), um den Übergang der Ionen in den Massenanalysator zu gewährleisten. Der Ionisierungsraum steht über eine Mikroöffnung (Durchmesser 100 µm) mit dem Hochvakuum des Massenspektrometers in Verbindung. Dabei strömt Stickstoff zwischen dem Orifice und der viel größeren Öffnung der Interface-Platte in den Ionisierungsraum. Der Stickstoff, der hier auch als Curtain-Gas bezeichnet wird, kollidiert mit den Molekülen des Elektrosprays. Dadurch wird größtenteils verhindert, daß Neutralteilchen in das Hochvakuum gesaugt werden. Zum anderen unterstützen die Kollisionen auch die Desolvatisierung der Ionen.

Die Nano-Elektrospray-Quelle besteht aus einer metallbedampften, leitfähigen Glaskapillare von nur wenigen Mikrometern Durchmesser an der Austrittsöff-

nung, über die kontinuierlich die Analytlösung in das elektrische Feld gelangt. Gleichzeitig bildet diese Kapillare auch die Gegenelektrode zur Interface-Platte, die zur Erzeugung der für den Ionisierungsprozeß notwendigen Potentialdifferenz gebraucht wird. Vor der Messung werden  $\sim 1 \mu\text{l}$  Analytlösung in die Glaskapillare pipettiert. Der Vorteil einer Nano-Spray-Quelle liegt in dem außerordentlich geringen benötigten Probenvolumen bei gleichzeitig erhöhter Empfindlichkeit (Abb. 2.4).

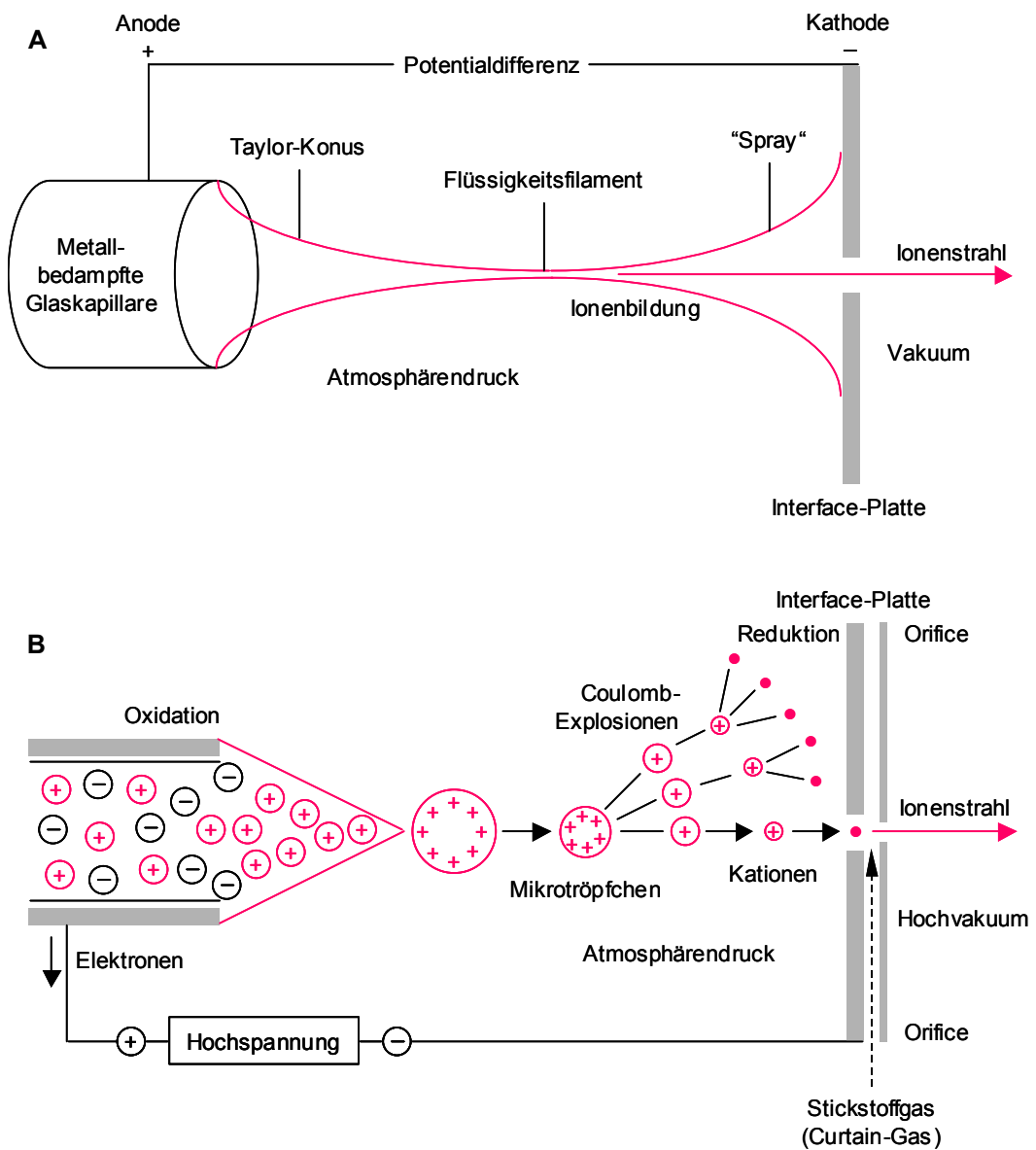


Abb. 2.4: Darstellung des (A) makroskopischen und (B) mikroskopischen ESI-Prozesses.

Im Gegensatz zur MALDI-MS entstehen bei der ESI-MS mehrfach geladene Peptid-Ionen. Einzelne Ionen können deshalb mehrere Signale mit unterschiedlichen Ladungen hervorrufen. Der Ladungszustand kann aufgrund des Isotopenmusters bestimmt werden. Natürlich vorkommende schwerere Isotope der einzelnen Elemente sind in statistischer Verteilung in den Analytmolekülen enthalten. Als monoisotopische Masse eines Elements oder Moleküls bezeichnet man die Masse des leichtesten Isotops. Als Element mit dem natürlich vorkommenden schweren Isotop ist bei Proteinen vor allem  $^{13}\text{C}$  von Bedeutung. Bei Messung der Masse eines Peptids bekommt man also ein Signal für die Monoisotopische Masse +1 (Einbau eines  $^{13}\text{C}$ -Atoms) usw. Im Spektrum ist der Massenunterschied von einer Masse sichtbar. Aus der Massendifferenz zwischen den Peaks für die einzelnen Isotope lässt sich der Ladungszustand berechnen: So beträgt er für ein doppelt geladenes  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ -Ion  $\frac{1}{2} = 0,5$ , für ein dreifach geladenes  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$  dagegen  $\frac{1}{3} = 0,33$  (Abb. 2.5). Bei Peptiden gilt dabei, dass bis zu einem Molekulargewicht von etwa 1500 Da das monoisotopische Signal am intensivsten ist, das Intensitätsmaximum sich aber bei größeren Massen hin zu den schwereren Isotopen verlagert [68].

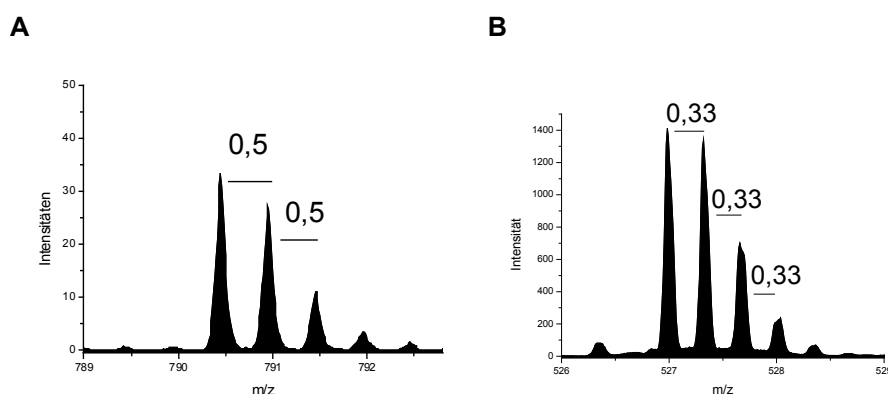


Abb. 2.5: Spektren mehrfach geladener Ionen. A) zeigt ein doppelt geladenes Ion; B) zeigt ein dreifach geladenes Ion.

Alle ESI-MS-Messungen wurden mit einem ESI-QqTOF (QSTAR Pulsar I, Applied Biosystems), ausgestattet mit einer Nanospray-Ionenquelle, durchgeführt. Dieses MS besteht aus einer Ionenquelle, den Quadrupolen Q1 und Q2, einem TOF und einem Detektor. Der Quadrupol Q1 dient als Massenanalysator im eigentlichen Sinne, während Q0 nur dazu dient, den Ionenstrom durch das Gerät zu

stabilisieren. Hinter Q1 befindet sich die Kollisionszelle Q2. Als weiterer Massenanalysator dient ein orthogonales TOF (Abb. 2.6).

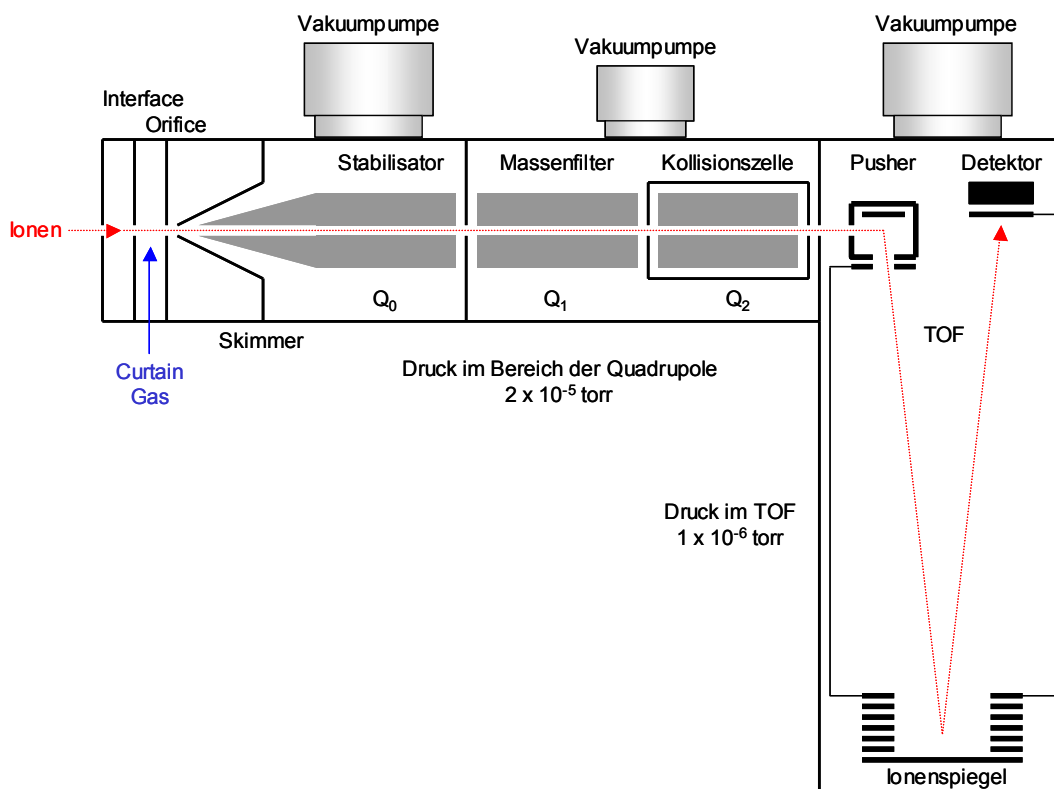


Abb. 2.6: Aufbau des ESI-QqTOF (QSTAR Pulsar I, Applied Biosystems). Dargestellt ist der Weg der Ionen ausgehend von der Ionenquelle durch die Quadrupole Q<sub>0</sub>, Q<sub>1</sub>, Q<sub>2</sub> (Kollisionszelle) und den TOF-Analysator zum Detektor.

#### 2.8.4 MS-Analyse mit dem ESI-QqTOF

Bei einem Quadrupol-Massenspektrometer werden unter vorgegebenen physikalischen Bedingungen nur Ionen mit einem bestimmten Masse/Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) zum Detektor durchgelassen. Dies wird durch eine Anordnung von vier parallelen stabförmigen Metallelektroden (Quadrupol) erreicht, die Ionen eines definierten  $m/z$ -Verhältnisses unter dem Einfluß eines kombinierten Wechsel- und Gleichspannungsfeldes auf einer stabilen oszillierenden Bahn durchlaufen können. Die drei wichtigsten Analyse-Modi sind nachfolgend beschrieben:

### Übersichtsspektrum (TOF-MS)

Bei der Aufnahme eines Übersichtsspektrums eines Peptidgemisches werden Quadrupole und Kollisionszelle so geschaltet, dass sie die Ionen auf einer stabilen Flugbahn halten und die eigentliche Massenanalyse im TOF erfolgt (Abb. 2.7).

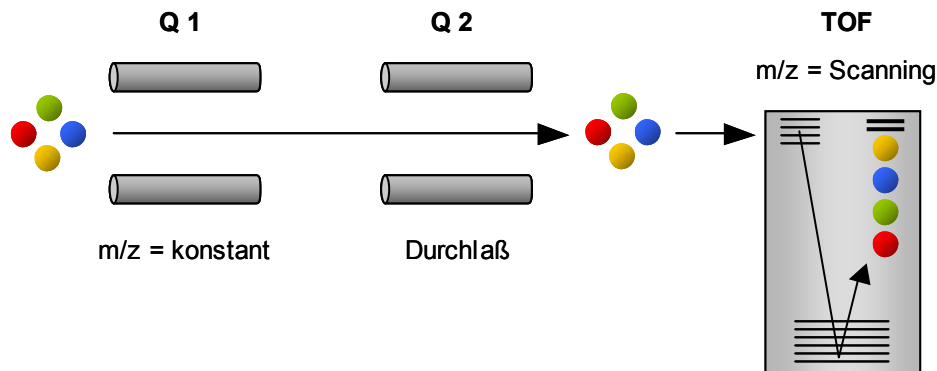


Abb. 2.7: Weg der Ionen durch das MS bei der Aufnahme eines Übersichtsspektrums.

### Fragment-Ionen-Analyse (MS/MS)

Bei der Fragment-Ionen-Analyse wird Q1 so eingestellt, daß nur Ionen einer bestimmten Masse durchgelassen werden. Diese Vorläufer-Ionen werden in Q2 fragmentiert und die entstandenen Produkt-Ionen anschließend im TOF analysiert (Abb. 2.8). In der Proteinchemie wird diese MS/MS-Technik zur Sequenzierung von Peptiden genutzt.

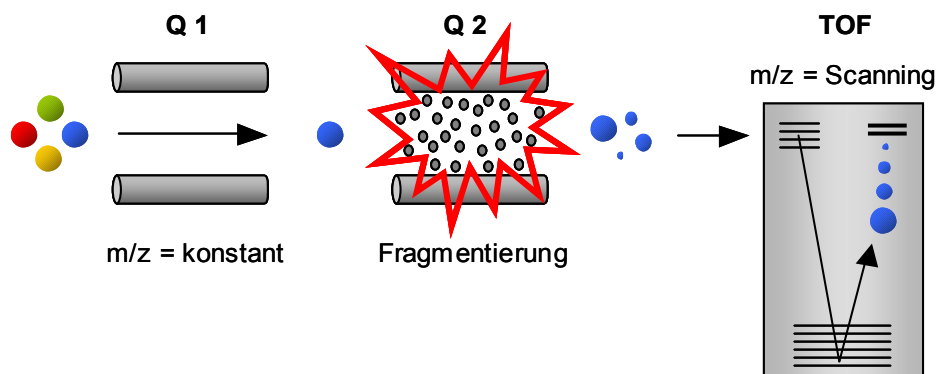


Abb. 2.8: Weg der Ionen durch das MS bei der Aufnahme eines MS/MS-Spektrums.

### Vorläufer-Ionen-Analyse (Precursor Ion Scan)

Wie bei der Aufnahme eines normalen Spektrums werden die Ionen des gesamten Massenbereiches nacheinander durch Q1 hindurchgelassen. Die Ionen erreichen dann Q2, wo sie fragmentiert werden. Der TOF-Analysator ist auf eine bestimmte, ausgewählte Fragmentmasse eingestellt, so daß über den TOF-Analysator nur Ionen detektiert werden können, wenn die entsprechenden Vorläufer-Ionen dieser Fragment-Ionen Q1 passieren konnten (Abb. 2.9). Dadurch können bestimmte Vorläufer-Ionen, beispielsweise glykosylierte oder phosphorylierte Peptide anhand ihrer spezifischen Produkt-Ionen (Abgangsgruppen wie Zucker-Fragmente oder Phosphatgruppe) in einem Gemisch identifiziert werden.

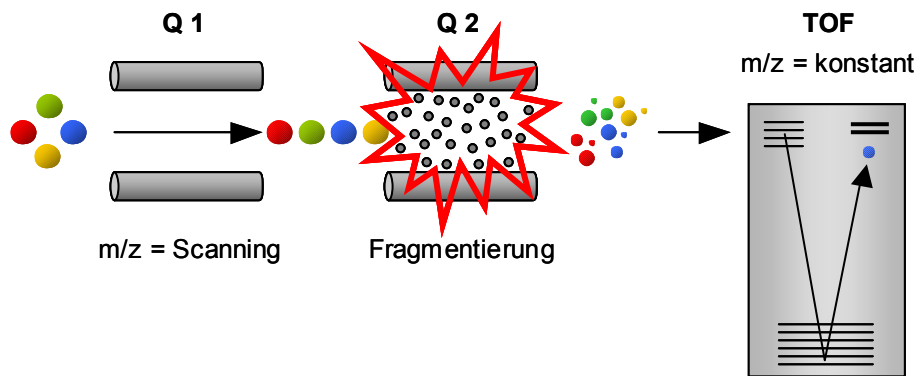


Abb. 2.9: Weg der Ionen durch das MS bei einem Precursor Ion Scan.

### 2.8.5 Sequenzierung von Proteinen und Peptiden mittels ESI-MS

Die Sequenzierung von Proteinen/Peptiden mittels ESI folgt i.a. dem Muster:

- (1) Protein-Isolierung (Gelelektrophorese, HPLC, etc.)
- (2) Enzymatische Spaltung (z.B. mit Trypsin, im Gel oder in Lösung)
- (3) Entsalzung (ZipTip als „Mikro-Chromatographie“)
- (4) Übersichtsspektrum des Peptidgemisches
- (5) Produkt-Ion-Selektion oder Precursor-Ion-Scan
- (6) MS/MS-Spektrum der Peptide zur Sequenzierung

Bei der Fragmentierung in der Kollisionszelle können sehr unterschiedliche Fragmente entstehen. Peptid-Ionen fragmentieren hauptsächlich an der Peptidbindung entlang des Peptid-Rückgrades. Ist die Ladung am C-Terminus lokalisiert, spricht man von einem y-Fragment, ist sie am N-Terminus lokalisiert, von einem b-Fragment. Diese Benennung orientiert sich an Roepstorff [69] und Johnson [70]. Abb. 2.10 zeigt das Schema der Peptidfragmentierung.

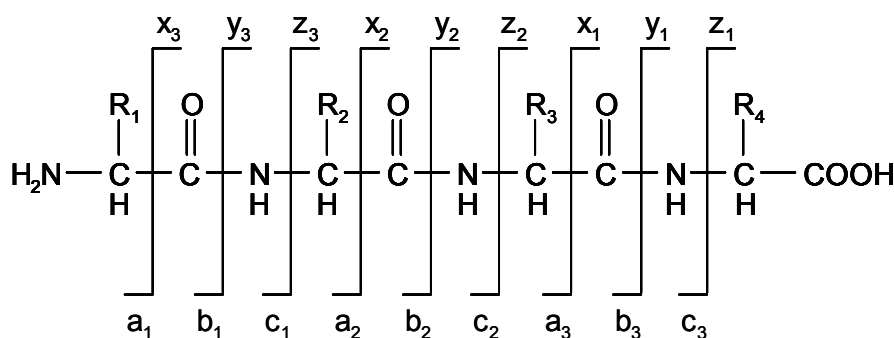


Abb. 2.10: Fragmentierungsverhalten von Peptiden nach Roepstorff und Johnson.

Der Massenabstand zwischen zwei Fragment-Ionen der gleichen Serie entspricht einer spezifischen Aminosäure. Entsprechend kann aus den Massenabständen der einzelnen Signale die Sequenz des Peptids abgelesen werden. Aminosäuren mit basischen Seitenketten wie Arginin oder Lysin können je nach ihrer Position im Peptid die Art der Fragmentierung beeinflussen. Sind sie in der Nähe des N-Terminus lokalisiert, wird das Spektrum im allgemeinen von einer b-Serie dominiert. Befinden sie sich in der Nähe des C-Terminus, so dominieren die y-Fragmente. Peptide, die durch einen tryptischen Verdau entstehen, werden fast immer von einer y-Serie dominiert, da sie C-terminal ein Arginin oder Lysin tragen.

## 2.8.6 Positiv-Ionen-Modus und Negativ-Ionen-Modus

Die massenspektrometrische Methodik erlaubt durch Umpolung der elektrischen Potentiale des Massenspektrometers die Analyse sowohl positiv geladener Analyt-Ionen (protonierte Moleküle) als auch negativ geladener Analyt-Ionen (deprotonierte Moleküle). Die daraus resultierenden Spektren werden auch als Positiv-Ionen-Spektren bzw. Negativ-Ionen-Spektren bezeichnet.

Die massenspektrometrische Sequenzierung von Proteinen und Peptiden ist nur im Positiv-Ionen-Modus möglich, da bisher nur bei protonierten Molekülen die Fragmentierung hinreichend untersucht wurde. Der Bruch des Peptidrückgrades während der Fragmentierung im Positiv-Ionen-Modus wird entscheidend durch die Lokalisation des zusätzlichen Protons beeinflusst. Im Negativ-Ionen-Modus ist die Lokalisation der negativen Ladung weitgehend unverstanden. Die hier während der Fragmentierung entstehenden Fragmente entsprechen nicht den Fragmenten, die im Positiv-Ionen-Modus entstehen. Dennoch leistet der Negativ-Ionen-Modus wertvolle Hilfe gerade bei dem Nachweis von Proteinphosphorylierungen. Während im Positiv-Ionen-Modus die Abspaltung der Phosphatgruppe nur indirekt durch den Verlust der Masse der Phosphatgruppe nachgewiesen werden kann, ist im Negativ-Ionen-Modus die abgespaltene Phosphatgruppe direkt nachweisbar.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Nachweis von Phosphohydroxyprolin durch Aminosäureanalyse

Der erste und bislang einzige Nachweis von Phosphohydroxylysin in einem Protein gelang Urushizaki und Seifter mittels Phosphoaminosäureanalyse nach radioaktiver Markierung [11]. Dazu wurde das Nährmedium einer Kollagen exprimierenden Zellkultur mit [ $^{32}\text{P}$ ]-Orthophosphat supplementiert, damit endogene Kinasen das  $^{32}\text{P}_i$  auf geeignete Aminosäurereste in den Proteinen übertragen konnten. Die Proteine wurden danach mittels chemischer Hydrolyse degradiert und die dadurch freigesetzten Aminosäuren wurden anschließend mittels zweidimensionaler Dünnschicht-Elektrophorese (2D-DE) separiert. Die einzelnen Phosphoaminosäuren ließen sich dann anhand ihres distinkten Migrationsmusters identifizieren.

Bei den Untersuchungen von Urushizaki und Seifter blieb Phosphohydroxyprolin unberücksichtigt, doch war anzunehmen, daß es sich mit der von ihnen verwendeten Methode nachweisen lassen müßte. Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit für den Nachweis von Phosphohydroxyprolin in einem ersten Ansatz die Methode von Urushizaki und Seifter adaptiert.

Um das spezifische Migrationsverhalten der Phosphoaminosäuren - unter besonderer Berücksichtigung von Phosphohydroxyprolin - bei der 2D-DE untersuchen zu können, mußte zunächst ein Referenzsystem etabliert werden. Die Aminosäuren Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin waren kommerziell erhältlich, Phosphohydroxyprolin und Phosphohydroxylysin wurden im eigenen Labor synthetisiert. Danach konnten die Elektrophorese-Bedingungen etabliert werden, bei denen die Phosphoaminosäuren reproduzierbar in distinkten Spots migrieren.

### 3.1.1 Migrationsverhalten von Phosphohydroxyprolin bei der 2D-DE

Untersucht wurde das Migrationsverhalten folgender phosphorylierter und unphosphorylierter Hydroxyaminosäuren und ähnlichen Verbindungen: Serin (S), Phosphoserin (pS), Threonin (T), Phosphothreonin (pT), Tyrosin (Y), Phosphotyrosin (pY), Hydroxyprolin (Hyp), Phosphohydroxyprolin (pHyp), Phosphodihydroxyprolin (p(2Hyp)), Hydroxylysin (Hyl), Phosphohydroxylysin (pHyl) und Phosphoethanolamin (PEA).

Die Aminosäuren wurden nach der Elektrophorese mit Ninhydrin gefärbt und zeigen sich als bläuliche Spots. Phosphohydroxyprolin und Hydroxyprolin besitzen eine sekundäre Aminogruppe und sind folglich Iminosäuren, die mit Ninhydrin einen charakteristischen gelblichen Komplex bilden.

Bei hinreichend saurem pH unterscheiden sich die meisten Phosphoaminosäuren von den nichtphosphorylierten Aminosäuren durch ihre negative Nettoladung und wandern im elektrischen Feld in Richtung Anode. Einzige Ausnahme hierbei ist Phosphohydroxylysin, daß den nichtphosphorylierten Aminosäuren ähnlich in Richtung Kathode wandert. Das Hauptaugenmerk lag allerdings auf dem Migrationsverhalten von Phosphohydroxyprolin, das sich zu dessen eindeutigen Identifizierung vom Migrationsverhalten der anderen chemischen Verbindungen hinreichend unterscheiden muß.

Bei pH 3,5 migrieren Phosphoserin und Phosphohydroxyprolin mit nahezu gleicher elektrophoretischer Mobilität. Bei pH 1,9 wandert Phosphohydroxyprolin zwar weiter als Phosphoserin, doch unterscheiden sich hier Phosphothreonin und Phosphotyrosin in ihrem Wanderungsverhalten nicht ausreichend voneinander (Abb. 3.1). Eine eindeutige elektrophoretische Trennung aller Phosphoaminosäuren in einer Dimension ist daher so noch nicht möglich.

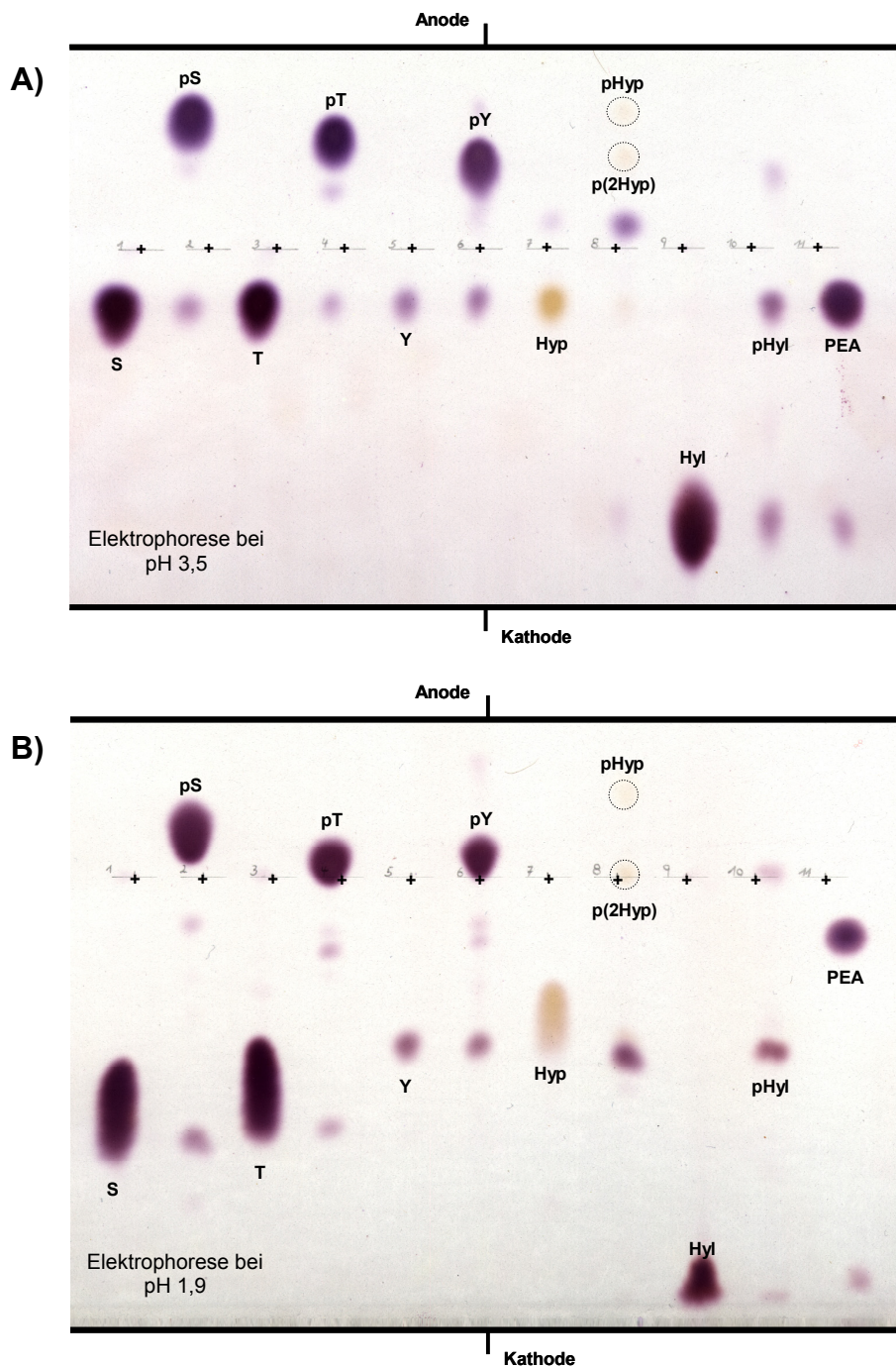


Abb. 3.1: Dünnschicht-Elektrophorese: Migration phosphorylierter und unphosphorylierter Hydroxyaminosäuren und ähnlichen Verbindungen bei pH 3,5 (A) und bei pH 1,9 (B): Die gelblichen Spots von Phosphohydroxylysin und Phosphodihydroxyprolin wurden zur besseren Kenntlichmachung umrandet. Die Position des jeweiligen Auftragepunktes (Startpunkt Elektrophorese) wurde mit einem Kreuz markiert.

Erst die zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese (2D-DE), d.h. die nacheinander erfolgende Elektrophorese in den beiden o.a. pH-Systemen, wobei die Elektrophoreserichtungen senkrecht zueinander orientiert sind, zeigte eine ausreichende Trennung. Phosphohydroxyprolin wanderte im Elektrophoresesystem bei pH 3,5 gleichauf mit Phosphoserin, ließ es aber in der zweiten Dimension bei pH 1,9 hinter sich zurück. Das Resultat zeigte, daß sich Phosphohydroxyprolin mittels 2D-DE von den anderen Phosphoamino­säuren trennen läßt (Abb. 3.2).

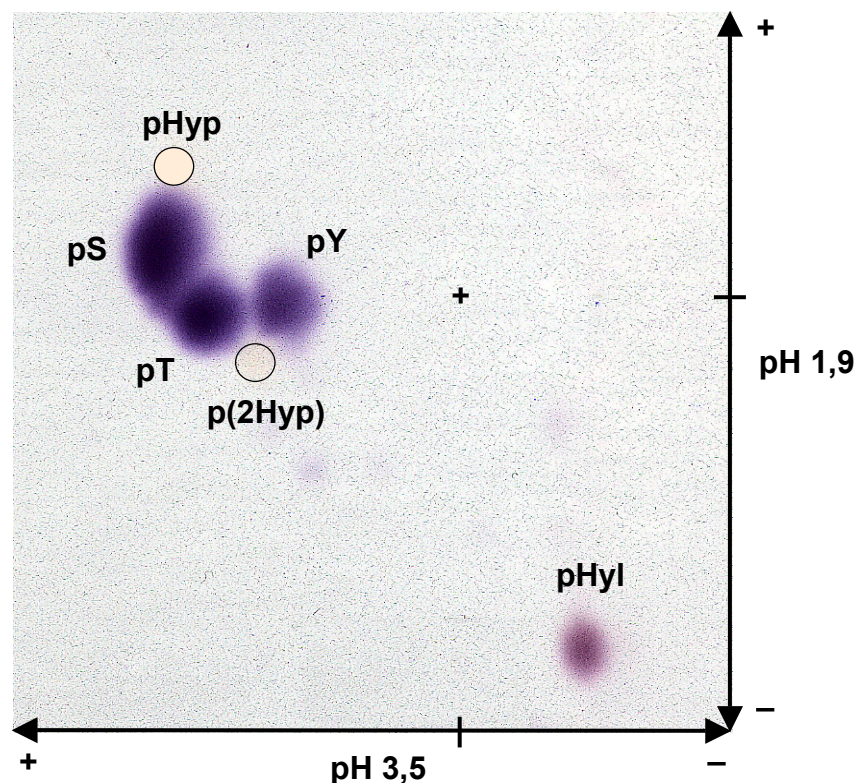


Abb. 3.2: Migration phosphorylierter Hydroxyamino­säuren bei der 2D-DE. Die gelblichen Spots von pHyp und p(2Hyp) sind zur besseren Sichtbarkeit umrandet. Die Position des Auftragepunktes wurde mit einem Kreuz markiert.

### 3.1.2 Phosphoamino­säureanalyse von <sup>32</sup>P-markierten Proteinen

Für die in vitro-Kultivierung einer Zelllinie wurden glatte Muskelzellen aus der Aorta embryonaler Ratten verwendet, da dieser Zelltyp in einem L-Ascorbinsäure enthaltenden Medium Kollagen synthetisiert. Da sich Kollagen durch einen hohen Gehalt an Hydroxylysin und Hydroxyprolin auszeichnet, war zu vermuten,

daß sich hier am wahrscheinlichsten eine Phosphorylierung von Hydroxylysin oder Hydroxyprolin während der Inkubationszeit mit radioaktivem Phosphat nachweisen lassen würde. Die Zellen wurden in Kultur gehalten bis ein Monolayer fast vollständig den Boden der Kulturflasche bedeckte. Die Zellen aus zwei Flaschen, inkubiert mit insgesamt 1,2 mCi [ $^{32}\text{P}$ ]-Orthophosphat für 6 Stunden, wurden nach der Zellernte dialysiert und lyophilisiert.

Vor der Dünnschicht-Elektrophorese mußten die Zellproteine durch chemische Hydrolyse zerlegt werden (saure Hydrolyse: 6 M HCL; 110°C; 2 h). Dem Erhalt potentieller Phosphatgruppen an der Seitenkette der Aminosäuren kam dabei besondere Bedeutung zu. Die Arbeiten von Martensen [10] zeigten die Stabilität von Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin gegenüber saurer Hydrolyse. Spätere Arbeiten von Urushizaki und Feramisco bestätigten auch die Stabilität von Phosphohydroxylysin [11] und Phosphohydroxyprolin [12]. Dennoch – unter den Bedingungen, die einen hinlänglichen Erhalt der O-Phosphate gewährleisten, ist lediglich eine partielle Hydrolyse der Proteine möglich. Ein nicht zu umgehender Nachteil dieser Methode ist daher, daß stets ein Teil der Aminosäuren, der in den nicht vollständig degradierten Peptiden verbleibt, unberücksichtigt bleibt.

Das Hydrolysat wurde zusammen mit Phosphohydroxylysin, Phosphoserin, Phosphothreonin, Phosphohydroxyprolin und Phosphotyrosin als Referenzamino-säuren auf eine Dünnschichtcellulose-Platte aufgetragen und mittels 2D-DE getrennt. Das resultierende Autoradiogramm zeigte nur zwei Spots, die sich je einer Phosphoaminosäure sicher zuordnen ließen. Durch Vergleich mit den Ninhydrin-gefärbten Spots der Referenzamino-säuren konnten die entsprechenden Spots des Autoradiogramms als  $^{32}\text{P}$ -markiertes Phosphoserin und Phosphothreonin identifiziert werden (Abb. 3.3).

Die 2D-Dünnschichtelektrophorese lieferte somit keinen Hinweis auf Phosphohydroxyprolin, Phosphohydroxylysin und Phosphotyrosin. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Methode konnte zu diesem Zeitpunkt weitestgehend ausgeschlossen werden, daß Hydroxyprolin (gleiches gilt für Hydroxylysin und Tyrosin) während der sechsständigen Inkubation der Zellkultur mit [ $^{32}\text{P}$ ]-Orthophosphat phosphoryliert wurde. Aber es konnte nicht ausgeschlossen werden, daß Phosphohydroxyprolin zwar vorhanden, während der Inkubationszeit aber nicht

neu gebildet wurde. Möglicherweise scheiterte der Nachweis von Phosphohydroxyprolin also an einem zu niedrigen oder nicht vorhandenen Substratumsatz während der Inkubationszeit.

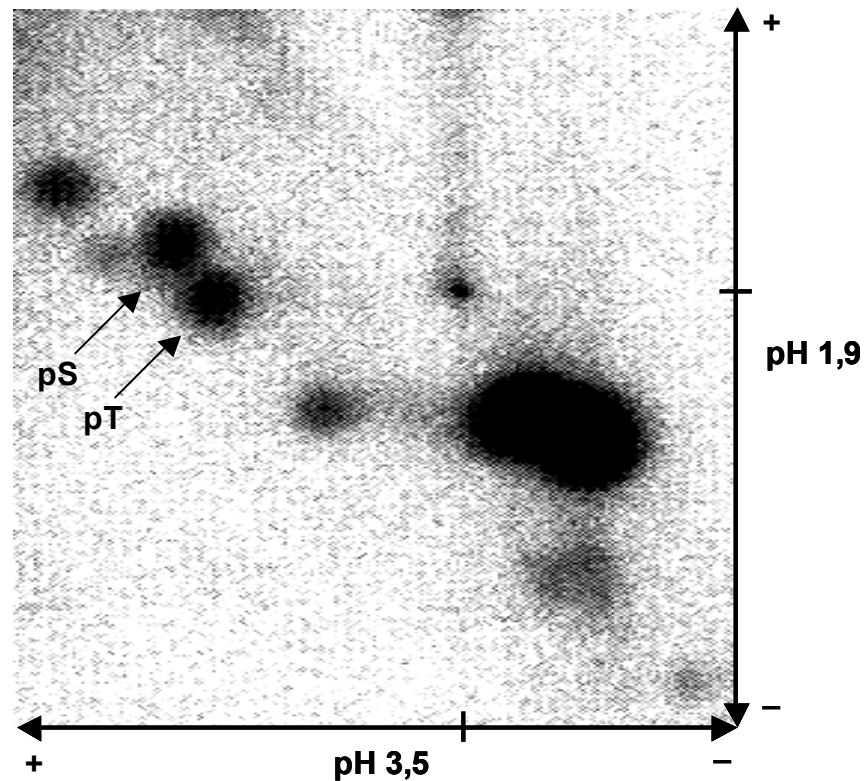


Abb. 3.3: Phosphoamino säureanalyse. Autoradiogramm des Proteinlysats nach 2D-DE : Phosphoserin und Phosphothreonin sind durch Pfeile markiert. Die großen Spots im unteren, rechten Quadranten sind unvollständig hydrolysierte Peptide.

Radioaktive Markierungen sind sehr sensitiv für Proteine mit hohem Phosphatumsatz, da in diesen Fällen während der kurzen Inkubationszeit durch die Kinasenaktivität relativ viel Phosphat eingebaut wird. Andererseits wird in Proteine mit niedrigem Phosphatumsatz während der Inkubationszeit nur sehr wenig, möglicherweise sogar kein Phosphat und damit keine nachweisbare Radioaktivität eingebaut. Sollte dieser Umstand auch für die Phosphorylierung von Hydroxyprolin in Kollagen zutreffen, wäre der Nachweis mittels einer nicht-radioaktiven Methode erfolgversprechender, als der Nachweis mittels klassischer 2D-Dünnschicht-Elektrophorese nach radioaktiver Markierung.

### 3.1.3 Nachweis von Phosphoaminosäuren mittels ESI-MS

Um sicherzustellen, daß das gesamte Phosphohydroxyprolin im Rahmen der Phosphoaminosäureanalyse erfaßt wird, wurde ein alternativer Ansatz mittels massenspektrometrischer Analyse mit ESI-MS verfolgt. ESI-MS hat den großen Vorteil, daß die Abspaltung der Phosphatgruppe von Phosphopeptiden mit hoher Sensitivität beobachtet werden kann. Darüber hinaus ist keine vorhergehende Hydrolyse des Probe erforderlich, was Verluste von Phosphoaminosäuren deutlich reduzieren sollte. Größter Vorteil der ESI-MS ist aber die Möglichkeit, die Sequenzposition einer identifizierten Phosphoaminosäure bestimmen zu können.

Die Fragmentierung und Dephosphorylierung von Phosphopeptiden mit ESI-MS wurde in den vergangenen Jahren intensiv untersucht. Bei der Fragment-Ionen-Analyse (MS/MS) von Phosphopeptiden wird bei der Aufnahme eines Positiv-Ionen-Spektrums die Abspaltung, d.h. der Verlust der Phosphatgruppe vom Vorläufer-Ion beobachtet und über den dadurch entstehenden Massenverlust indirekt nachgewiesen. Bei der Aufnahme eines Negativ-Ionen-Spektrums läßt sich die abgespaltene Phosphatgruppe aufgrund ihrer negativen Ladung direkt beobachten.

Die Phosphatgruppe kann in Form zweier verschiedener Fragmente abgespalten werden. Bei Phosphoserin und Phosphothreonin läßt sich der charakteristische Verlust von  $\text{HPO}_3$  und  $\text{H}_3\text{PO}_4$  beobachten, während bei Phosphotyrosin im allgemeinen nur der  $\text{HPO}_3$ -Verlust beobachtet werden kann. Das MS/MS-Spektrum zeigt dann neben dem Vorläufer-Ion mit der Masse  $[\text{M}+\text{H}]^+$  auch die Fragment-Ionen  $[\text{MH}-\text{HPO}_3]^+$  und/oder  $[\text{MH}-\text{H}_3\text{PO}_4]^+$ . Entsprechend zeigt das Negativ-Ionen-Spektrum neben dem Vorläufer-Ion mit der Masse  $[\text{M}-\text{H}]^-$  auch die Fragment-Ionen  $[\text{PO}_3]^-$  und/oder  $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ .

Doch nicht jedes Fragment-Ion eignet sich uneingeschränkt zum Nachweis einer phosphorylierten Aminosäure. Bei der Aufnahme eines Positiv-Ionen-Spektrums besteht die Gefahr einer Verwechslung zwischen *O*-Phosphoaminosäure und *O*-Sulfoaminosäure. Da die *O*-Sulfoaminosäuren sehr ähnliche monoisotopische Massen wie die *O*-Phosphoaminosäuren haben ( $\Delta_m = 0,0095$  Da), kann mit den meisten Massenspektrometern nicht sicher zwischen den beiden Substanzklassen unterschieden werden. Bei der vergleichenden Fragment-Ionen-Analyse (MS/MS)

von Phosphotyrosin und Sulfotyrosin [71] zeigten beide Aminosäurederivate im Positiv-Ionen-Spektrum neben der Masse des Vorläufer-Ions  $[M+H]^+$  auch ein Fragment-Ionen mit der Masse  $[MH-80]^+$ .

In Analogie zu diesem Ergebnis ist auch bei den übrigen Phosphoaminosäuren, bzw. den analogen Sulfoestern, ein Auftreten der Fragment-Ionen mit den Massen  $[MH-80]^+$  und  $[MH-98]^+$  zu erwarten. Die nachfolgende Tabelle (Tab. 3.1) zeigt die möglichen Fragment-Ionen im Positiv-Ionen-Spektrum.

Tab. 3.1: Fragment-Ionen im Positiv-Ionen-Spektrum.

| Massendifferenz zum Vorläufer-Ion $[M+H]^+$ | Fragment-Ionen der <b>O-Phospho</b> aminosäuren | Fragment-Ionen der <b>O-Sulfo</b> aminosäuren |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 80 Da                                       | $[MH-HPO_3]^+$                                  | $[MH-SO_3]^+$                                 |
| 98 Da                                       | $[MH-H_3PO_4]^+$                                | $[MH-H_2SO_4]^+$                              |

Im Gegensatz dazu kann im Negativ-Ionen-Spektrum zwischen Phosphoaminosäuren und Sulfoaminosäuren klar unterschieden werden. Peptide mit Sulfotyrosin zeigen im Negativ-Ionen-Spektrum das Fragment-Ion  $[SO_3]^-$  mit einer Masse von 80 Da und unter Umständen auch noch die beiden Fragment-Ionen  $[SO_4]^-$  mit 96 Da und  $[HSO_4]^-$  mit der Masse von 97 Da [72].

Ein Fragment-Ion mit einer Masse von 97 Da, das Fragment-Ion  $[H_2PO_4]^-$ , tritt auch bei den Phosphoaminosäuren auf (Ausnahme ist pTyr), doch lassen sich die Phosphoaminosäuren anhand des für sie charakteristischen Fragment-Ions  $[PO_3]^-$  mit 79 Da eindeutig von den Sulfoaminosäuren unterscheiden (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Fragment-Ionen im Negativ-Ionen-Spektrum.

| Masse des<br>Fragment-Ions $[M-H]^-$ | Fragment-Ionen der<br><b>O-Phospho</b> amino-säuren | Fragment-Ionen der<br><b>O-Sulfo</b> amino-säuren |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 79 Da                                | $[PO_3]^-$                                          | kein Fragment-Ion                                 |
| 80 Da                                | kein Fragment-Ion                                   | $[SO_3]^-$                                        |
| 96 Da                                | kein Fragment-Ion                                   | $[SO_4]^-$                                        |
| 97 Da                                | $[H_2PO_4]^-$                                       | $[HSO_4]^-$                                       |

Die Sulfatisierung von Tyrosinresten in Proteinen ist eine gängige posttranslationale Modifikation [73]. Die Sulfoester sind aber gegenüber Säuren deutlich weniger stabil als die Phosphoester, so daß anzunehmen war, daß *O*-Sulfoamino-säuren die saure Hydrolyse der Proteine als Vorbehandlung zur Phosphoamino-säureanalyse nicht überdauern würden, doch Sulfoserin, Sulfothreonin und Sulfo-tyrosin können in Anwesenheit von Sulfat-Salzen auch als Nebenprodukte der sauren Hydrolyse entstehen, [74].

Die Bildung von *O*-Sulfoamino-säuren läßt sich zwar durch sofortige Neutralisierung des Reaktionsansatzes nach der Hydrolyse mit Ammoniumhydrogencarbonat verringern [75], konnte aber bei den eigenen Hydrolysen nicht völlig ausgeschlossen werden. Entsprechend wurde für alle Untersuchungen sowohl ein Positiv-Ionen-Spektrum als auch ein Negativ-Ionen-Spektrum aufgenommen. Die Abbildung 3.4 zeigt exemplarische MS/MS-Spektren von pSer, pThr, pTyr, pHyp und pHyl. Im Positiv-Ionen-Spektrum konnten so stets weniger als 50 pmol einer Phosphoamino-säure und im Negativ-Ionen-Spektrum sogar weniger als 1 pmol nachgewiesen werden.

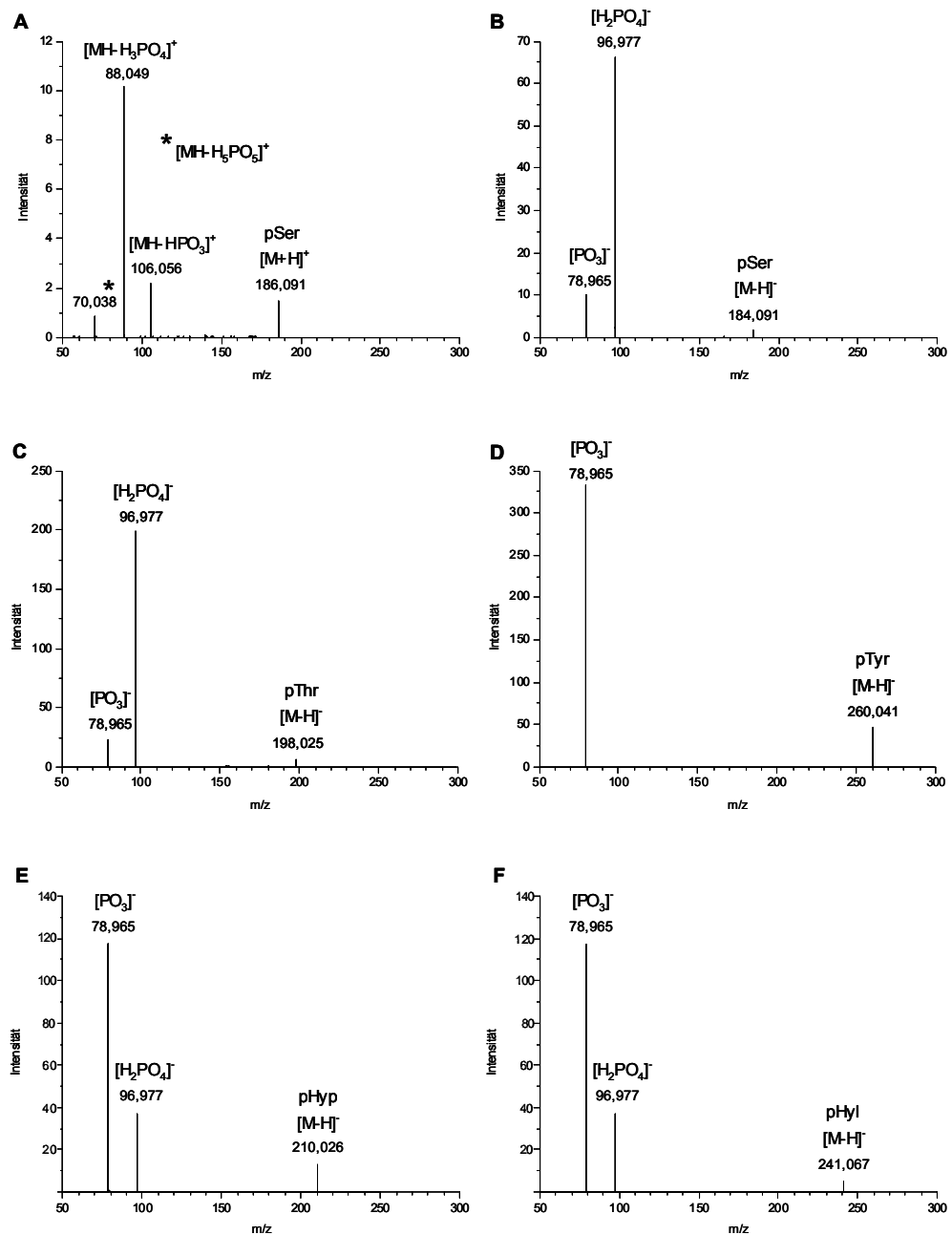


Abb. 3.4: MS/MS-Spektren der O-Phosphoamino säuren: Positiv-Ionen-Spektrum pSer (A). Negativ-Ionen-Spektren von pSer (B), pThr (C), pTyr (D), pHyp (E) und pHyl (F). Ausgangsmaterial der Messungen waren Lösungen der Phosphoamino säuren in  $H_2O$  (5 pmol/ $\mu$ l).

Nach der Hydrolyse (6 M HCL, 110°C, 120 Minuten) von je 20 pmol der synthetischen Phosphopeptide RRLIEDAepSAARG und RRLIEDAepYAARG ließen sich die beiden Phosphoamino säuren pSer und pTyr im Negativ-Ionen-Spektrum

anhand ihrer Fragment-Ionen nachweisen (Abb. 3.5). Noch geringere Mengen einer Phosphoaminosäure nachzuweisen war nur in Einzelfällen möglich, da bei noch geringeren Stoffmengen die gerätespezifischen Einflüsse (Elektrospray) die Qualität der jeweiligen Messung zu sehr beeinflussen. Die Sensitivität des massenspektrometrischen Nachweises ist somit vergleichbar mit der einer chemischen Derivatisierung von Phosphoaminosäuren mit anschließender RP-HPLC zur Analyse der Retentionszeiten.

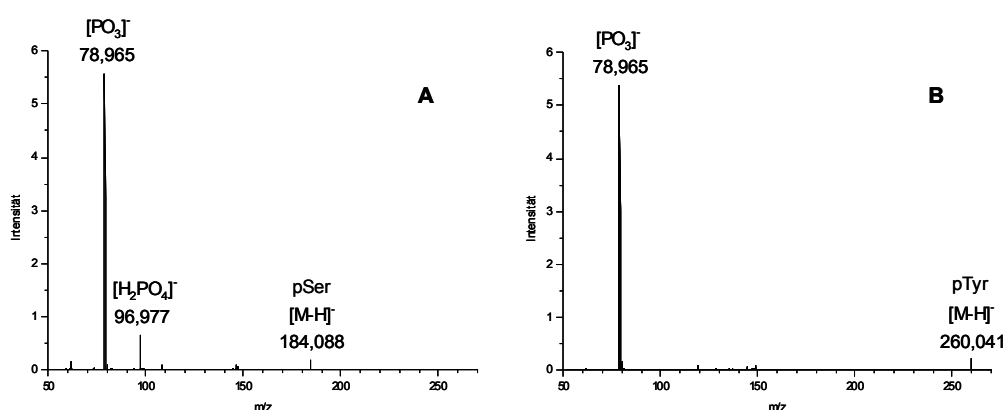


Abb. 3.5: Negativ-Ionen-Spektrum (MS/MS) von A) pSer, durch Hydrolyse des Peptids RRLIEDAEpSAARG (20 pmol) freigesetzt; B) pTyr, durch Hydrolyse des Peptids RRLIEDAEpYAARG (20 pmol) freigesetzt.

### 3.1.4 Massenspektrometrische Analyse von Kollagenhydrolysaten

Nach der Etablierung der Phosphoaminosäureanalyse mittels ESI-MS konnte untersucht werden, ob sich Phosphoaminosäuren in Kollagen nachweisen lassen. Erneut wurde Kollagen wegen seines hohen Gehalts an Hydroxylysin und Hydroxyprolin als Untersuchungsobjekt ausgewählt. Je 5 mg der säurelöslichen Kollagene III, VI, VII und VIII wurden hydrolysiert, lyophilisiert und nach Resuspension in 50 µl 50% MeOH, 1% Ameisensäure mittels MS/MS analysiert. Mit diesem Verfahren konnten in den untersuchten Kollagenhydrolysaten Hinweise auf verschiedene *O*-Phosphoaminosäuren gefunden werden. Einzig für Phosphotyrosin ließ sich kein Hinweis finden. Die nachfolgende Tabelle zeigt im Überblick, in welchen Kollagenen sich Anzeichen für welche Phosphoaminosäuren finden ließen (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Phosphoaminosäuren, für deren Existenz sich in den einzelnen Kollagenhydrolysaten Hinweise finden ließen.

| Kollagen-Typ | pSer | pThr | pTyr | pHyp | pHyl |
|--------------|------|------|------|------|------|
| III          | □    | □    | □    | ■    | □    |
| VI           | □    | □    | □    | ■    | □    |
| VII          | ■    | ■    | □    | ■    | □    |
| VIII         | ■    | ■    | □    | ■■   | ■    |

Legende: Konnte eines der charakteristischen Fragment-Ionen  $[\text{PO}_3]^-$  oder  $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$  nachgewiesen werden, ist dies mit einem dunklen Quadrat indiziert (■). Konnte kein  $[\text{PO}_3]^-$ -Signal nachgewiesen werden, ist dies durch ein helles Quadrat angezeigt (□). In Kollagen VIII waren die Signale für pHyp in allen untersuchten Proben am deutlichsten, deshalb werden hier zwei Quadrate (■■) gezeigt.

Bei der Auswertung der Spektren fiel auf, daß die Signalintensitäten insgesamt sehr niedrig waren, verglichen mit den Signalintensitäten der Messungen der reinen Phosphoaminosäuren. Eine quantitative Aussage über den Phosphoryierungsgrad der untersuchten Kollagene ist aber nicht möglich, da die Signalintensität nicht proportional zur Phosphoaminosäure-Konzentration in Lösung ist, sondern auch von einer Vielzahl weiterer Faktoren abhängt.

Die Übersichts-Spektren der jeweiligen Kollagen-Hydrolysate zeigten keine Signale, die den Massen der Phosphoaminosäuren entsprachen. Möglicherweise wurden die Signale der Phosphoaminosäuren durch andere Signale überlagert oder unterdrückt. Das Vorhandensein von Phosphoaminosäuren im Hydrolysat war deshalb aber nicht ausgeschlossen. Bei der Aufnahme der MS/MS-Spektren wurde darum die theoretische Masse der jeweiligen Phosphoaminosäure als Vorläufer-Ionen-Masse vorgegeben. Auf diese Weise konnten für alle *O*-Phosphoaminosäuren (Ausnahme: Phosphotyrosin) charakteristische Fragment-Ionen  $[\text{PO}_3]^-$  mit 78,965 Da und  $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$  mit 96,977 Da nachgewiesen werden. Im Fall von pHyl wurde nur  $[\text{PO}_3]^-$  mit 78,965 Da beobachtet. Abb. 3.6 zeigt jeweils ein Fragment-Ionen-Spektrum der entsprechenden Phosphoaminosäure im Hydrolysat von 5 mg Kollagen VIII.

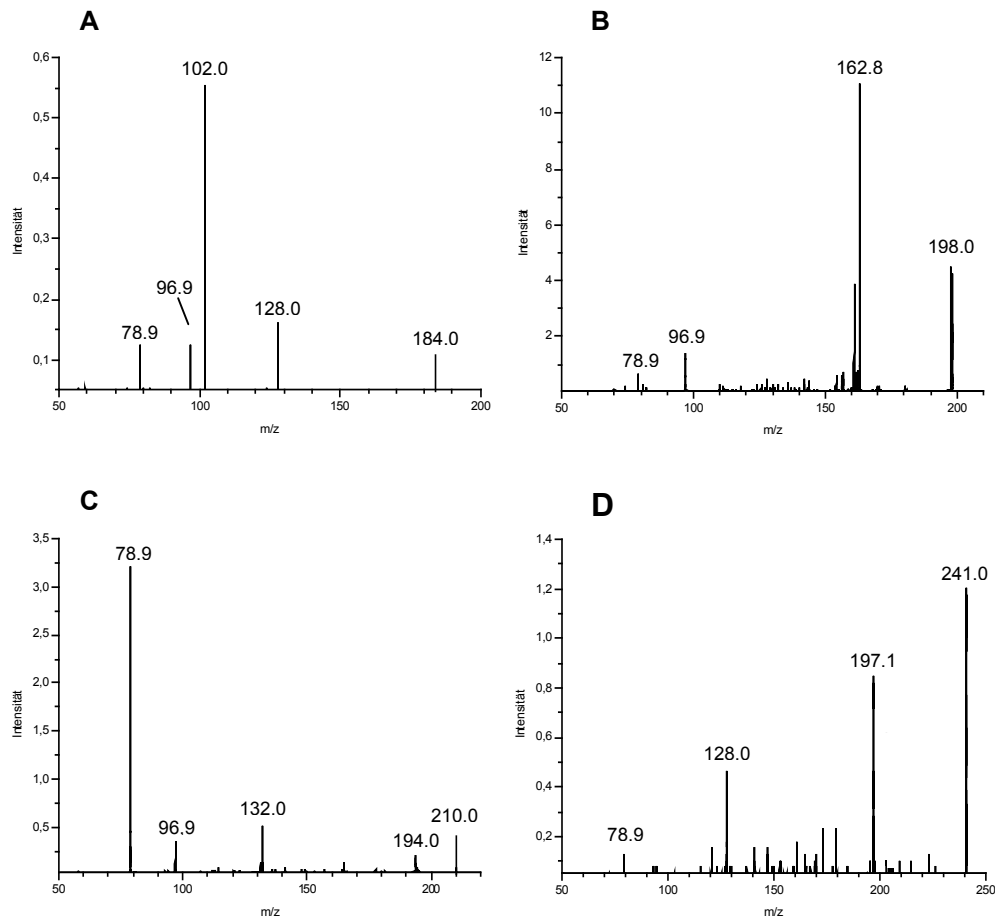


Abb. 3.6: Hydrolysat von Kollagen VIII (5 mg): MS/MS-Spektren (Negativ-Ionen-Spektren) der Vorläufer-Ionen (A)  $m/z = 184,092$  (pSer), (B)  $m/z = 198,014$  (pThr), (C)  $m/z = 210,026$  (pHyp), (D)  $m/z = 241,067$  (pHyl). Die Fragment-Ionen mit  $m/z = 78,965$  und  $m/z = 96,977$  sind charakteristisch für eine Phosphat-Abspaltung.

Zur Kontrolle wurde mit dem reinen Lösungsmittel (50% MeOH, 1% Ameisensäure) analog vorgegangen. Im Gegensatz zu den Messungen der Kollagenhydrolysate zeigten sich hier erwartungsgemäß keine charakteristischen Fragment-Ionen der Phosphoaminosäuren. Wurde jedoch das reine Lösungsmittel genau wie die Kollagenproben den Bedingungen der Hydrolyse unterworfen, zeigten sich bei den anschließenden MS/MS-Messungen Signale, deren Massen zwar nicht denen der charakteristischen Fragment-Ionen der Phosphoaminosäuren entsprachen, sich aber nur geringfügig von diesen Massen unterschieden. Die Herkunft dieser Signale konnte nicht aufgeklärt werden. Es war zwar unwahrscheinlich, daß es sich um „falsch positive“ Signale von Phosphoaminosäuren handelte (wegen der Massen-

differenz zu den „echten“ Signalen), doch wurde klar, daß die Hydrolyse von Kollagenproben und „Leerkontrollen“ Bedingungen hervorrief, die geeignet waren, bei den Messungen Signale zu induzieren, die leicht für solche von Phosphoaminosäuren gehalten werden konnten.

Man kann daher festhalten, daß die Phosphoaminosäureanalyse mittels ESI-MS im Bereich der gerätechnischen Nachweisgrenze nur bedingt geeignet ist. Die Ergebnisse lieferten so zwar durchaus Hinweise auf die Existenz von Phosphoaminosäuren in Kollagen, waren aber als Beweis für deren Vorhandensein alleine nicht ausreichend. Dieser Beweis konnte nur durch weitergehende methodische Ansätze erbracht werden.

### **3.2 Immunologischer Nachweis von Phosphohydroxyprolin**

Der Hinweis auf Phosphohydroxyprolin in Kollagen aus dem globalen Ansatz der Phosphoaminosäureanalyse wurde mit immunologischer Methodik weiterverfolgt. Mit einem für Phosphohydroxyprolin spezifischen Antikörper sollte das Ergebnis der Phosphoaminosäureanalyse verifiziert werden. Ein solcher Antikörper würde darüber hinaus die Möglichkeit bieten, auch in anderen Proteinen mögliches Phosphohydroxyprolin nachzuweisen.

Dafür war es unbedingt erforderlich, daß ein solcher spezifischer Antikörper Phosphohydroxyprolin unabhängig von Umgebungsvariablen, wie der Aminosäuresequenz, würde erkennen können. Da ein solcher Antikörper kommerziell nicht erhältlich war, wurden zwei verschiedene Phosphohydroxyprolin enthaltende Peptide synthetisiert und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet (Immunisierung durchgeführt von SEQLAB, Göttingen). Die aus den Immunisierungen hervorgegangenen polyklonalen Seren wurden auf ihre Spezifität hin überprüft und das geeignetste Serum für die immunologischen Nachweise verwendet. Das genaue Vorgehen zur Gewinnung der spezifischen Antikörper ist in Kapitel 2.6 beschrieben.

### 3.2.1 Herstellung polyklonaler Antiseren gegen Phosphohydroxyprolin

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene polyklonale und auch monoklonale Antikörper gegen Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin beschrieben. Die Art der Seitenkette der Aminosäuren beeinflusst die immunogene Potenz der Epitope. Die am stärksten epitopbestimmenden Aminosäuren sind polar und solche mit großen Seitenketten, vor allem diejenigen mit Ringstruktur. Phosphoaminosäuren verfügen daher über eine große immunogene Potenz. Doch es gibt entscheidende Unterschiede: Während es spezifische Antikörper gibt, die Phosphotyrosin sequenzunabhängig erkennen, werden Phosphoserin und Phosphothreonin nicht sequenzunabhängig erkannt. Dazu ist ihre Seitenkette trotz der Phosphatgruppe zu klein. Auch ist bei den Antikörpern gegen Phosphoserin und Phosphothreonin eine gewisse Kreuzreaktivität gegenüber der jeweils anderen Phosphoaminosäure zu beobachten, bedingt durch den geringen strukturellen Unterschied. Dennoch gibt es hochspezifische Antikörper, die bestimmte Sequenzen erkennen, die Phosphoserin oder Phosphothreonin enthalten.

Im Falle des Phosphohydroxyprolins sind die formalen Voraussetzungen günstig: Eine polare Seitenkette mit Ringstruktur. Zudem wird durch die Besonderheiten der Iminosäure eine Änderung im Verlauf des Peptidrückgrades induziert. Durch diesen Knick wird die Seitenkette des Phosphohydroxyprolins besonders exponiert.

Zur Generierung der polyklonalen Antiseren wurden zwei synthetische Peptide (Col-2p und Col-5p) mit einem in Kollagen häufig vorkommendem Sequenzmotiv ((Gly-Pro-Hyp)<sub>n</sub>) gewählt. Die Sequenzen der beiden Peptide waren identisch, unterschieden sich aber in ihrem Phosphorylierungsgrad. Eines der Peptide enthielt zwei (Col-2p), das andere fünf (Col-5p) Phosphohydroxyprolinreste. Es wurden jeweils zwei Kaninchen immunisiert, so daß insgesamt vier polyklonale Seren gewonnen wurden (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Sequenzen der zur Immunisierung eingesetzten synthetischen Peptide. Die pHyp-Positionen sind hervorgehoben.

| Peptid | Peptidsequenz                                                                                | Antiseren  |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Col-2p | CGPHypGP <b>pHyp</b> GPHypGP <b>pHyp</b> GPHyp-NH <sub>2</sub>                               | 2055, 2056 |
| Col-5p | CGP <b>pHyp</b> GP <b>pHyp</b> GP <b>pHyp</b> GP <b>pHyp</b> GP <b>pHyp</b> -NH <sub>2</sub> | 2057, 2058 |

### 3.2.2 Spezifität der polyklonalen Antiseren

Die in den Immunsereen enthaltenen polyklonalen Antikörper wurden zunächst mittels Protein A-Affinitätschromatographie aus den Seren isoliert und angereichert. Die Spezifität der Antikörper wurde daraufhin mittels ELISA und Dot-Blot getestet. Zur Ermittlung der Spezifität wurde die Wechselwirkung der Antikörper mit vier verschiedenen synthetischen Peptiden untersucht. Die Peptide waren sequenzhomolog, unterschieden sich aber in ihrem Phosphorylierungsgrad, d.h. in der Anzahl phosphorylierter Hydroxyprolinreste. Tabelle 3.5 zeigt die Sequenzen der Peptide im Überblick.

Tab. 3.5: Sequenzen der synthetischen Peptide zur Bestimmung der Spezifität der Antiseren. Die pHyp-Positionen in den Sequenzen sind hervorgehoben.

| Peptid | Peptidsequenz                                                                               |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| Col-0p | GPHypGPHypGPHypGPHypGPHyp-NH <sub>2</sub>                                                   |
| Col-1p | GPHypGPHypGP <b>pHyp</b> GPHypGPHyp-NH <sub>2</sub>                                         |
| Col-2p | GPHypGP <b>pHyp</b> GPHypGP <b>pHyp</b> GPHyp-NH <sub>2</sub>                               |
| Col-5p | GP <b>pHyp</b> GP <b>pHyp</b> GP <b>pHyp</b> GP <b>pHyp</b> GP <b>pHyp</b> -NH <sub>2</sub> |

Zunächst wurden die Antiseren hinsichtlich ihrer Spezifität mittels ELISA untersucht. Von den vier untersuchten Seren zeigte Antiserum 2055 die geringste Spezifität. Die Peptide wurden unabhängig vom Phosphorylierungsgrad nahezu gleichermaßen gut erkannt. Die Antikörper dieses Serums wechselwirkten offensichtlich mit dem in allen vier Peptiden gleichermaßen vorkommenden Gly-Pro-Hyp-

Motiv. Die Antiseren 2056 und 2057 zeigten zwar eine Präferenz für Sequenzen, die Phosphohydroxyprolin enthielten, doch wurde das unphosphorylierte Peptid ebenfalls erkannt. Somit waren die Antiseren 2055, 2056 und 2057 wegen ihrer Kreuzreaktivität mit dem unphosphorylierten Peptid für die Suche nach Phosphohydroxyprolin ungeeignet.

Das Antiserum 2058 zeigte hingegen eine hohe Spezifität für die phosphorylierten Peptide. Diese wurden entsprechend ihres Phosphorylierungsgrades, d.h. gemäß der Anzahl der phosphorylierten Hydroxyprolinreste erkannt. Im gesamten beobachteten Konzentrationsbereich wurde das Peptid mit fünf Phosphohydroxyprolinresten am besten erkannt, dann das Peptid mit zwei Phosphohydroxyprolinresten, gefolgt von dem Peptid mit einem Phosphohydroxyprolinrest. Das unphosphorylierte Peptid wurde unabhängig von der Antigenkonzentration nicht erkannt. Dies ließ den Schluß zu, daß im Falle des Antiserums 2058 das Gly-Pro-Hyp-Motiv der Peptidsequenz für die Epitoperkennung keine Rolle spielte. Antiserum 2058 benötigte demnach für die Erkennung seines Epitops mindestens eine phosphorylierte Aminosäureseitenkette (Abb.3.7).

Der ELISA-Test zeigte zwar, daß Antiserum 2058 mindestens eine phosphorylierte Aminosäureseitenkette zur Erkennung seines Epitops benötigte, ließ aber offen, ob die Detektion spezifisch war für einen Phosphohydroxyprolinrest, oder ob darüber hinaus eine Kreuzreaktivität zu anderen Phosphoaminosäuren bestand. Zur Klärung dieser Frage wurden weitere Peptide synthetisiert, die in ihrer Sequenz den schon bekannten Peptiden mit dem wiederholten Gly-Pro-Hyp-Motiv entsprachen, in denen aber ein Phosphohydroxyprolinrest durch einen anderen Phosphoaminosäurerest (pSer, pThr, pTyr) substituiert wurde. Geklärt werden mußte zudem noch die Frage, ob ein Phosphohydroxyprolinrest auch in anderer Sequenzumgebung durch das Antiserum 2058 detektiert wird. Dazu wurde ein Peptid synthetisiert, in dem ein Phosphohydroxyprolinrest in einer völlig anderen Sequenzumgebung vorlag. Da das Antiserum bei geeigneter Spezifität zur Detektion von Phosphohydroxyprolin in isolierten Proteinen mittels Western-Blot eingesetzt werden sollte, erfolgten die Tests zur genaueren Spezifitätsbestimmung mittels Dot-Blot. Beim Dot-Blot wird das Antigen auf eine Nitrocellulose-Membran aufgetragen, so wie auch beim Western-Blot das Antigen auf einer Nitrocellulose-Membran vorliegt.

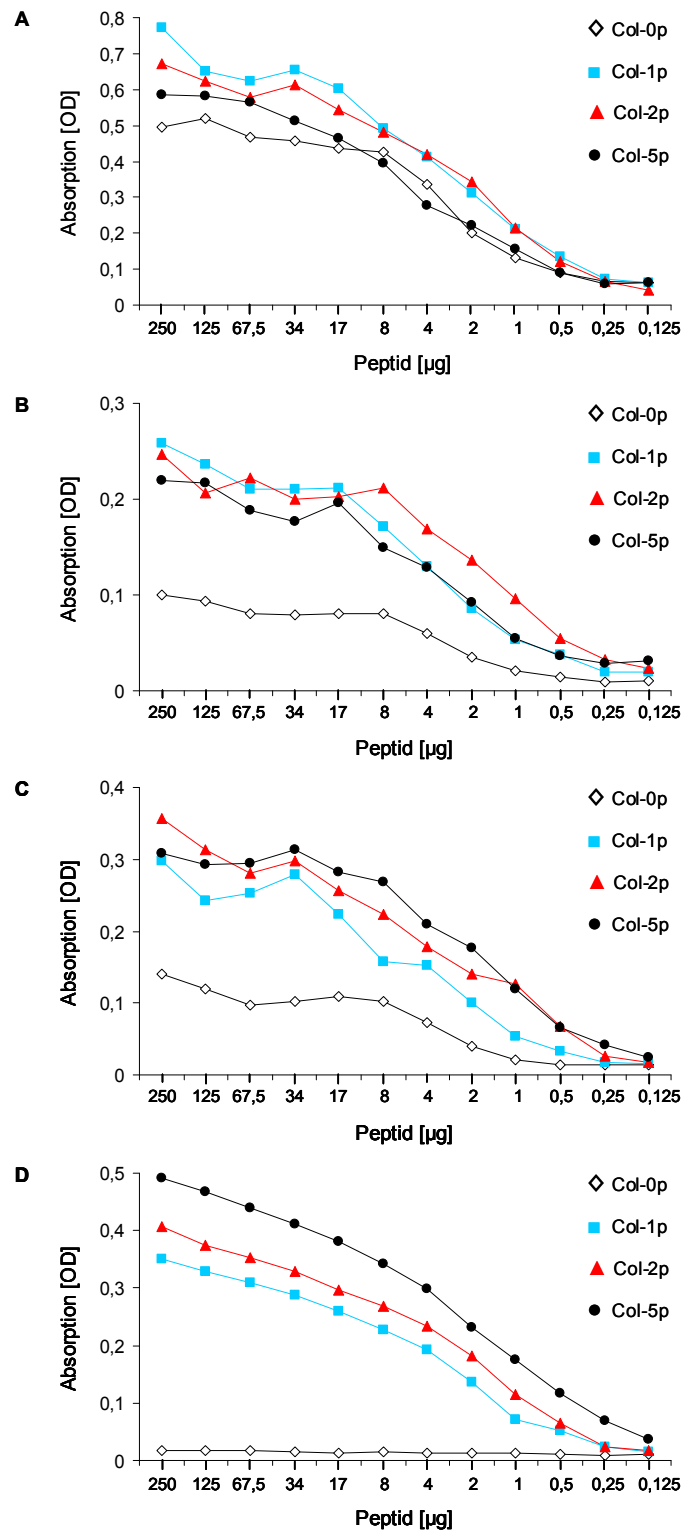


Abb. 3.7: ELISA: Die Spezifität der polyklonalen Antiseren 2055 (A), 2056 (B), 2057 (C) und 2058 (D) gegen die vier synthetischen Peptide mit unterschiedlichem Phosphorylierungsgrad.

Die Ergebnisse des Dot-Blots bestätigten die Ergebnisse des ELISA-Tests zur Spezifität des Antiserums 2058. Die Phosphohydroxyprolin enthaltenden Sequenzen wurden abhängig von der Anzahl ihrer Phosphohydroxyprolinreste unterschiedlich stark detektiert. Am stärksten wurde das Peptid mit fünf Phosphohydroxyprolinresten erkannt, schwächer das Peptid mit zwei Phosphohydroxyprolinresten und am wenigsten stark das Peptid mit nur einem Phosphohydroxyprolinrest. Das unphosphorylierte Peptid wurde nicht detektiert. Ebenfalls nicht detektiert wurden die Peptide mit gleicher Sequenzumgebung, aber einer anderen Phosphoamino-säure statt Phosphohydroxyprolin. Das Antiserum 2058 erkannte also ausschließlich Phosphohydroxyprolinreste. Im Dot-Blot-Experiment wurde auch das Peptid BCB2 erkannt, in dessen Sequenz ein Phosphohydroxyprolin in einer gänzlich anderen Sequenzumgebung eingebaut wurde. Die Summe der Einzelergebnisse zeigte, daß das Antiserum 2058 spezifisch einen Phosphohydroxyprolinrest unabhängig von seiner flankierenden Sequenzumgebung erkennen konnte (Abb. 3.8).

| Blot                                                                                | Peptid | Peptidsequenz                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | Col-5p | GP <b>pHyp</b> GP <b>pHyp</b> GP <b>pHyp</b> GP <b>pHyp</b> GP <b>pHyp</b> -NH <sub>2</sub> |
|  | Col-2p | GPHypGP <b>pHyp</b> GPHypGP <b>pHyp</b> GPHyp-NH <sub>2</sub>                               |
|  | Col-1p | GPHypGPHypGP <b>pHyp</b> GPHypGPHyp-NH <sub>2</sub>                                         |
|  | Col-0p | GPHypGPHypGPHypGPHypGPHyp-NH <sub>2</sub>                                                   |
|  | BCB2   | KDNSDFG <b>pHyp</b> LPQVQSVR-NH <sub>2</sub>                                                |
|  | Col-pS | GPHypGPHypGP <b>pSer</b> GPHypGPHyp-NH <sub>2</sub>                                         |
|  | Col-pT | GPHypGPHypGP <b>pThr</b> GPHypGPHyp-NH <sub>2</sub>                                         |
|  | Col-pY | GPHypGPHypGP <b>pTyr</b> GPHypGPHyp-NH <sub>2</sub>                                         |

Abb. 3.8: Dot-Blot: Spezifität des polyklonalen Antiserums 2058 gegenüber synthetischen Peptiden. Aufgetragen wurden je Spot 2 x 0,5 µl Peptidlösung (1 µg/µl). Rechts neben dem Blot ist jeweils die Bezeichnung und die Sequenz des aufgetragenen Peptides angegeben.

### 3.2.3 Untersuchung von Kollagenen mit dem pHyp-spezifischen Antiserum

Das Phosphohydroxyprolin-spezifische Antiserum 2058 ermöglichte es, die mittels massenspektrometrischer Phosphoaminosäureanalyse untersuchten Kollagene noch einmal im Dot-Blot-Verfahren zu überprüfen. Neben den vier Kollagenen vom Typ III, VI, VII und VIII, die in saurem Milieu löslich sind, wurden auch noch die ebenfalls kommerziell erhältlichen Kollagen-Typen I, II und V getestet. Diese Kollagen-Typen waren in wässriger Umgebung nur sehr schlecht löslich. Selbst unter denaturierenden Bedingungen (Reduktion der Disulfidbrücken mit DTT, 95°C für 5 Minuten) und Zugabe von 30% v/v Acetonitril gingen allenfalls geringe Anteile des Proteins in Lösung. Auf der Blot-Membran (Nitrocellulose) waren daher an den Auftragspositionen der Kollagen-Typen I, II und V helle Spots erkennbar, die auf ausgefallenes Protein hinwiesen. Für eine Erkennung der Kollagen-Typen I, II und V durch das pHyp-spezifische Antiserum 2058 fanden sich keine Hinweise. Sollte in diesen Kollagenen dennoch Phosphohydroxyprolin vorhanden sein, so wurde es möglicherweise nicht von den Antikörpern erkannt, weil diese Kollagene mutmaßlich nach wie vor in tripelhelikaler Struktur auf der Membran vorlagen. Sehr schwach erkennbar war eine Reaktion im Falle der Kollagen-Typen III und VII. Deutlich stärker war die Reaktion des pHyp-spezifischen Antiserums mit den Kollagen-Typen VI und VIII (Abb. 3.9).

| Blot                                                                                | Kollagen-Typ  |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
|  | Kollagen I    |
|  | Kollagen II   |
|  | Kollagen III  |
|  | Kollagen V    |
|  | Kollagen VI   |
|  | Kollagen VII  |
|  | Kollagen VIII |

Abb. 3.9: Dot-Blot (Chemolumineszenz): Untersuchung verschiedener Kollagen-Typen mit dem Phosphohydroxyprolin-spezifischen Antiserum 2058. Aufgetragen wurden je Spot 2 x 2 µl Kollagenlösung (5 µg/µl).

Vergleicht man die Ergebnisse der Phosphoaminosäureanalyse mittels ESI-MS mit dem Dot-Blot, bestätigen sich die Ergebnisse der beiden voneinander unabhängigen Methoden gegenseitig. Dies gilt insbesondere für Kollagen-Typen VI und VIII – hier finden sich mit beiden Methoden Hinweise auf das Vorhandensein von Phosphohydroxyprolin.

Nach den bis dahin vorliegenden Ergebnissen war es naheliegend, besonders Kollagen VI und Kollagen VIII massenspektrometrisch mittels ESI-MS/MS zu untersuchen. Erste Messungen, mit dem Ziel, das Phosphohydroxyprolin auch in der Aminosäuresequenz nachzuweisen und so Auskunft über die Position der Phosphorylierung des Hydroxyprolins zu erhalten, zeigten jedoch schon bald, daß dies so nicht möglich war. Die Ursache hierfür liegt in den strukturellen Besonderheiten des Kollagens begründet.

Die tripelhelikale Struktur großer Bereiche der Kollagenmoleküle reduziert deren Spaltbarkeit durch proteolytische Enzyme drastisch. Auch eine Vorbehandlung mit Kollagenasen, den einzigen Enzymen, die Kollagenketten in kleinere Einheiten spalten können, brachte keine Verbesserung einer nachfolgenden Trypsin-Spaltung. Die Aufspaltung eines Proteins in kleinere Peptide geeigneter Größe, die Messungen in einem Massenbereich ermöglichen, in denen ein Massenspektrometer seine höchste Empfindlichkeit hat, ist aber die Voraussetzung für seine MS/MS-Sequenzierung. Zur Hydrolyse eines Proteins ist Trypsin das geeignetste Enzym, weil die Produkte des Spaltprozesses, die sogenannten tryptische Peptide, am Carboxylende stets eine basische Aminosäure tragen, damit gut ionisierbar und für die Massenspektrometrie besonders geeignet sind. Trypsin schneidet ein Protein für gewöhnlich auf der Carboxylseite von Arginin oder Lysin. Nicht aber, wenn carboxyterminal von Arginin oder Lysin eine Iminosäure in der Proteinsequenz folgt. In Kollagen stehen deshalb kaum geeignete Trypsinschnittstellen zur Verfügung, weil die überwiegende Zahl der Arginin- und Lysinreste N-Terminal von Prolin oder Hydroxyprolin vorkommt. Alternative proteolytische Enzyme eignen sich wegen ihres starken Eigenverdaus und der deutlich schlechteren Reproduzierbarkeit des enzymatischen Proteinverdaus (verglichen mit Trypsin) nicht für die massenspektrometrische Sequenzanalyse. Infolgedessen waren nur sehr wenige für die massenspektrometrische Analyse ver-

wertbare Peptide zu erhalten. Dies war in keinem Versuchsansatz ausreichend für eine Positionsbestimmung eventuell vorhandener Phosphorylierungsstellen.

Erschwerend kam noch hinzu, daß a) für einige Kollagene die Aminosäuresequenzen bisher nicht bekannt sind, und b) wenn sie bekannt sind, dann auf Nukleinsäuresequenzdaten beruhen und infolgedessen nur Prolinpositionen bekannt sind, aber noch unbekannt ist, ob es sich um ein Hydroxyprolin handeln könnte. Dies zu überprüfen, bringt eine weitere Schwierigkeit mit sich: Hydroxyprolin in einer de novo-Sequenzierung der Aminosäuresequenz mittels MS/MS-Messungen zweifelsfrei zu identifizieren ist oft nicht möglich, da sich die monoisotopische Masse von Hydroxyprolin (113,05 Da) nur wenig von der monoisotopischen Masse von Leucin/Isoleucin (113,08 Da) unterscheidet. Bei der Sequenz-Analyse kommt noch hinzu, daß die repetitive Abfolge des Sequenzmotifs Gly-X-Y und der hohe Anteil von Prolin und Hydroxyprolin in den Positionen X und Y die Zuordnung zu einem bestimmten Sequenzabschnitt oft nicht möglich macht.

Aus den genannten Gründen wurde die Fokussierung auf Kollagene aufgegeben und in einem breiteren Ansatz wurde mit dem Phosphohydroxyprolin-spezifischen Antiserum auch nach anderen potentiell Phosphohydroxyprolin-enthaltenden Proteinen gesucht.

### **3.2.4 Untersuchung von Gewebeprotein mit pHyp-spezifischem Antiserum**

Für die Proteinpräparation wurden Gewebetypen ausgewählt, in denen sich auch Kollagene vom Typ VI und VIII finden. Dadurch sollte eine Vergleichbarkeit zu den bisherigen Ergebnissen ermöglicht werden. Es wurden Herz, Aorta und Augen von insgesamt sechs adulten Ratten präpariert. Herz und Aorta gelten als reich an den Kollagen-Typen III und VI. Kollagen VIII findet sich besonders in der Descemet-Membran des Auges, aber auch in den Zellen des Endothels. Auf eine spezielle Kollagenpräparation wurde aber verzichtet. Statt dessen wurden die löslichen Proteine aus den jeweiligen Geweben isoliert und weiter untersucht. Damit war die Möglichkeit gewahrt, auch in anderen Proteinen, abseits der Kollagenfamilie, potentielle Kandidaten mit Phosphohydroxyprolin zu finden. Die Iso-

lierung der Proteine aus dem Gewebe erfolgte stets unter besonderer Berücksichtigung des Erhalts posttranslatinaler *O*-Phosphate.

Nach der Proteinpräparation aus den drei Gewebetypen Herz, Aorta und Auge sollte zunächst ein Dot-Blot Aufschluß darüber geben, ob sich mit dem pHyp-spezifischen Antiserum ein Hinweis auf Phosphohydroxyprolin in den isolierten Proteinen findet. Bei allen aus den Geweben isolierten Proteinfractionen zeigte sich eine deutliche Reaktion mit dem pHyp-spezifischen Antiserum. Am stärksten ausgeprägt war die Reaktion mit den Proteinproben aus Herz und Auge, etwas schwächer die Reaktion mit der Proteinprobe aus der Aorta. Kollagen VIII wurde in diesem Dot-Blot als Referenzprobe eingesetzt. Die Intensität der Reaktion des Antiserums mit jeder der Gewebeproteinproben war stärker als die Reaktion des Antiserums mit Kollagen VIII (Abb. 3.10).

| Blot                                                                                | Gewebe        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
|  | Herz          |
|  | Aorta         |
|  | Auge          |
|  | Kollagen VIII |

Abb. 3.10: Dot-Blot: Nachweis von Phosphohydroxyprolin mit dem Antiserum 2058 in Gewebeproteinen. Aufgetragen wurden je Spot 2 x 2 µl Proteinlösung (5 µg/µl). Rechts neben dem Blot ist das Gewebe angegeben, aus dem die Proteine isoliert wurden. Kollagen VIII wurde als Referenzprobe aufgetragen, ebenfalls 2 x 2 µl Proteinlösung (5 µg/µl).

### 3.2.5 Nachweis von Phosphohydroxyprolin mittels Western-Blot

Zur näheren Charakterisierung der Proteine wurde je 100 µg Protein aus den Gewebepreparationen gelelektrophoretisch nach dem Molekulargewicht getrennt. Eine SDS-PAGE mit einem Acrylamid-Gradienten von 5-18% führte zu einer guten Trennung der Proteine in distinkte Banden (Abb. 3.11 A). Dabei zeigte sich bei den Proben aus Herz und aus Auge ein ähnliches Bandenmuster. Das Ban-

denmuster der Aorta-Probe unterschied sich deutlich von den beiden anderen. Anschließend wurden die Proteine aus dem Gel elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und es wurde mittels Western Blot untersucht, ob sich mit dem pHyp-spezifischen Antiserum ein Hinweis auf Phosphohydroxyprolin in den isolierten Proteinen finden ließe (Abb. 3.11 B).

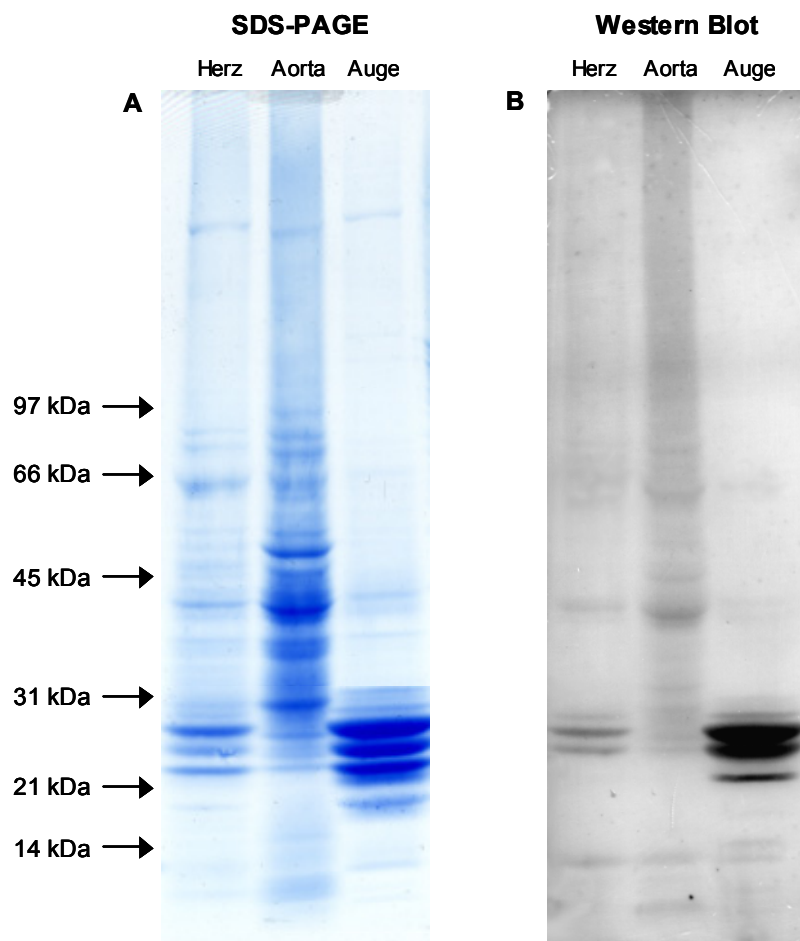


Abb. 3.11: A) SDS-PAGE und B) Western-Blot: Je 100 µg Protein aus Herz, Aorta und Auge wurden in einem Gradientengel (5-18%) getrennt und mit Coomassie angefärbt (A), bzw. mit pHyp-spezifischem Antiserum markiert (B).

Es zeigten sich mehrere markante Banden im Molekulargewichtsbereich zwischen 20 und 30 kDa bei den aus Herz und Augen präparierten Proteinen. Bei den aus Aorta-Gewebe isolierten Proteinen zeigten sich keine so deutlich markierten

Banden. Die im Western Blot markierten Banden ließen sich entsprechenden Banden im Gel zuordnen. Andere, im Gel durch Coomassie ähnlich intensiv angefärbte Banden, wurden im Western Blot nicht markiert. Dieser Umstand wies auf eine spezifische Wechselwirkung des Antiserums mit Phosphohydroxyprolin in den markierten Proteinbanden hin.

### 3.2.6 Western-Blot nach enzymatischer Dephosphorylierung

Zur Verifizierung des Western Blots mit dem Phosphohydroxyprolin-spezifischen Antiserum wurde die Auswirkung einer Vorbehandlung der Proteine mit zwei unterschiedlichen Phosphatasen untersucht. Dazu wurden a) je 1 mg der Proteine aus Herz, Aorta und Auge mit je 50 Units der Serin/Threonin-Proteinphosphatase Calcineurin und b) je 1 mg der Proteine aus Herz, Aorta und Auge mit je 10 Units Alkalischer Phosphatase behandelt. Je 100 µg der auf diese Weise vorbehandelten Proteine wurden mittels SDS-PAGE (5-18%) nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Zum Vergleich wurden je 100 µg unbehandelte Proteine aus Herz, Aorta und Auge untersucht. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine wiederum auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet und mit dem Phosphohydroxyprolin-spezifischen Antiserum behandelt.

Der Vergleich der Bandenmuster des Western-Blots zeigte keinerlei Unterschiede zwischen den unbehandelten Proteinen und denen, die mit Calcineurin vorbehandelt wurden. Ganz anders bei den Proteinen, die mit Alkalischer Phosphatase vorbehandelten wurden. Bei diesen Proben wurden durch das Phosphohydroxyprolin-spezifische Antiserum keine Proteine erkannt (Abb. 3.12). Dieses Ergebnis läßt nur den Schluß zu, daß das Serin- und Threonin-spezifische Calcineurin die Phosphohydroxyprolinreste nicht dephosphorylieren konnte, aber die unspezifisch alle *O*-Phosphate angreifende Alkalische Phosphatase die Phosphohydroxyprolinreste dephosphoryliert hat und die verbliebenen Hydroxyprolinreste in den Proteinen durch das Phosphohydroxyprolin-spezifische Antiserum nicht erkannt wurden.

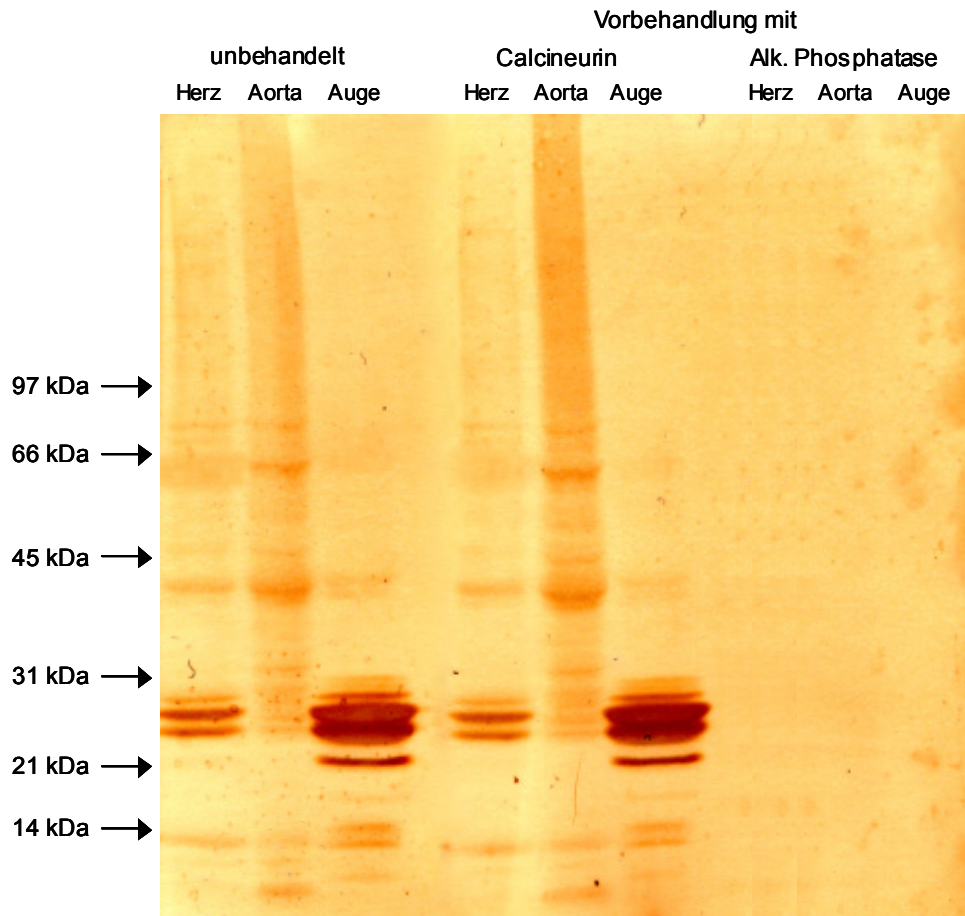


Abb. 3.12: Western Blot mit pHyP-spezifischem Antiserum: Je 100 µg Protein aus Herz, Aorta und Auge wurden aufgetragen. Die drei linken Proben waren unbehandelte Proteine, die drei mittleren Proben wurden mit Calcineurin und die drei rechten Proben wurden mit Alkalischer Phosphatase vorbehandelt.

### 3.3 Nachweis von Phosphohydroxyprolin in $\alpha$ -Kristallin A

#### 3.3.1 Identifizierung der Phosphohydroxyprolin enthaltenden Proteine

Die sieben markantesten Banden im Molekulargewichtsbereich zwischen 20 und 30 kDa aus Herz und Auge, die im Western-Blot von dem Phosphohydroxyprolin-spezifischen Antiserum detektiert wurden, konnten gut Banden im Coomassie-gefärbten Polyacrylamid-Gel zugeordnet werden. Die entsprechenden Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, mit Trypsin im Gel gespalten und die daraus resultierenden Peptide zur Identifizierung mittels ESI-MS/MS sequenziert. Vor

den Messungen wurden die Peptide mittels C<sub>18</sub>-RP-Chromatographie von allen störenden Salzen befreit. Außerdem wurden sie auf diese Weise angereichert, um ihre Konzentration in der Meß-Lösung zu erhöhen. Zur Verringerung der Komplexität der Massenspektren wurden die Peptide in mehreren Stufen mit sukzessiv ansteigendem Methanol-Anteil im Lösungsmittel (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%) von dem C<sub>18</sub>-RP-Material eluiert.

In allen sieben der untersuchten Banden fanden sich Proteine der Kristallin-Familie. Abbildung 3.13 zeigt, welche Proteine dem Bandenmuster des Western Blots zugeordnet werden konnten. Sowohl in den aus Herz als auch den aus Augen präparierten Proteinen konnten  $\beta$ -Kristallin B2,  $\beta$ -Kristallin A4 und  $\alpha$ -Kristallin B identifiziert werden. In einer weiteren Bande der aus Augen präparierten Proteinen wurde  $\alpha$ -Kristallin A identifiziert.

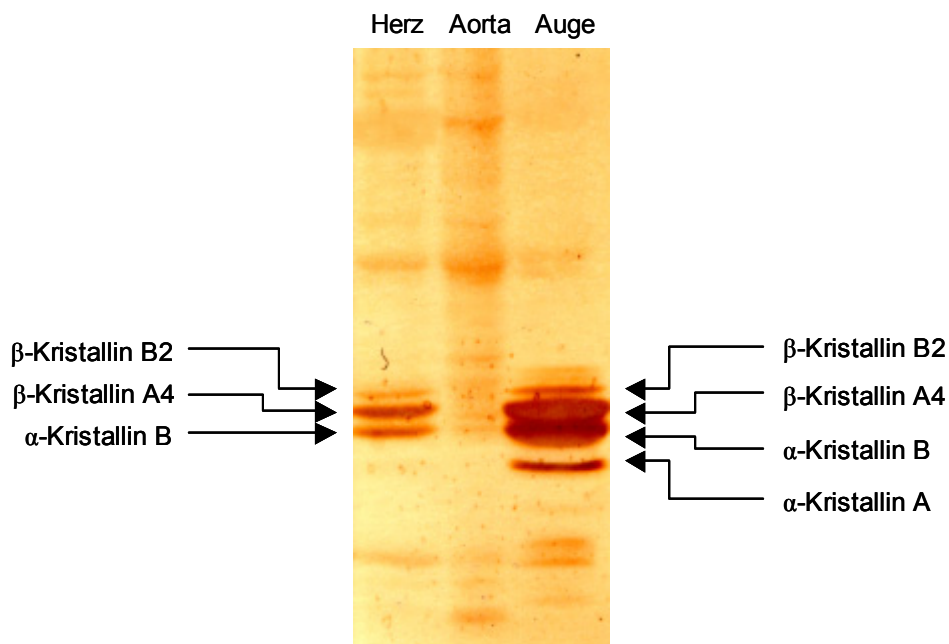


Abb. 3.13: Identifizierung der von dem pHyp-spezifischen Antiserum detektierten Banden. Die dazu korrespondierenden Proteine aus der SDS-PAGE wurden mittels ESI-MS/MS-Sequenzierung identifiziert.

### 3.3.2 Identifizierung einer Sequenzposition von Phosphohydroxyprolin

Die  $\alpha$ -Kristallin A-Bande aus der Augenpräparation war im Coomassie-gefärbten Gel deutlich erkennbar angefärbt und auch das Phosphohydroxyprolin-spezifische Antiserum reagierte im Western-Blot stark mit dieser Bande. Zudem kam ihr ein gewisses Alleinstellungsmerkmal zu, da sie nur in der Augenpräparation, nicht aber in der Herzpräparation von dem Antiserum erkannt wurde (Abb.3.13). Für die Identifizierung und genaue Lokalisation von Phosphohydroxyprolin in der Proteinsequenz wurde deshalb zuerst  $\alpha$ -Kristallin A aus den Augen untersucht.

Die massenspektrometrischen Analysen der mit 30% Methanol eluierten Peptide (RP-HPLC nach Trypsin-Spaltung) ergaben die Spektren mit den deutlichsten Signalen. Im MS-Spektrum der 30%-Fraktion zeigten sich auch charakteristische Signale, die auf eine Hydroxylierung und Phosphorylierung eines Peptides hindeuten. Bei einer Hydroxylierung ist eine Massenzunahme von 16 Da und bei einer Phosphorylierung eine Massenzunahme von 80 Da die Folge. Im MS-Spektrum der 30%-Fraktion traten die für beide Modifikationen typischen Massendifferenzen auf (Abb. 3.14).

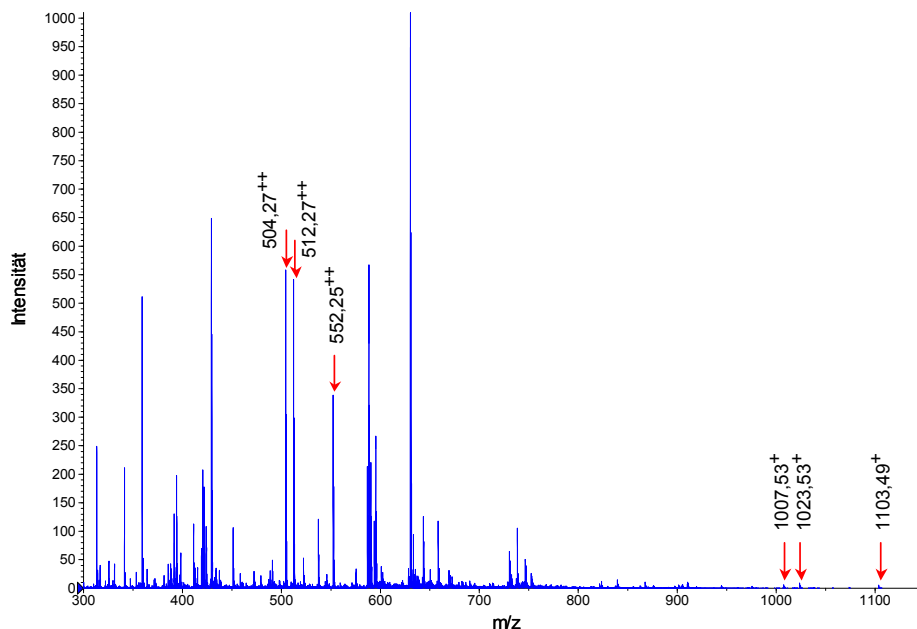


Abb. 3.14: MS-Spektrum von  $\alpha$ -Kristallin A nach Trypsin-Spaltung. Die markierten Signale der  $[M+2H]^{2+}$ - und der  $[M+H]^+$ -Ionen weisen mit ihren charakteristischen Massendifferenzen auf eine mögliche Hydroxylierung und Phosphorylierung eines der Peptide hin.

Die Massendifferenz mit  $\Delta = 16$  Da zwischen den beiden einfach geladenen  $[M+H]^+$ -Ionen mit  $m/z = 1007,53$  und  $m/z = 1023,53$  und die Massendifferenz mit  $\Delta = 8$  Da zwischen den korrespondierenden doppelt geladenen  $[M+2H]^{2+}$ -Ionen mit  $m/z = 504,27$  und  $m/z = 512,27$  wies auf eine Hydroxylierung hin. Die Massendifferenz mit  $\Delta = 80$  Da zwischen den  $[M+H]^+$ -Ionen mit  $m/z = 1023,53$  und  $m/z = 1103,49$  und die Massendifferenz mit  $\Delta = 40$  Da zwischen den korrespondierenden  $[M+2H]^{2+}$ -Ionen mit  $m/z = 512,27$  und  $m/z = 552,25$  wies auf eine Phosphorylierung hin (Abb 3.15).

Um diesen Hinweisen nachzugehen, wurden MS/MS-Messungen zur Sequenzierung der Peptide durchgeführt. Wegen der höheren Signalintensität wurden die drei  $[M+2H]^{2+}$ -Ionen für die MS/MS-Messungen ausgewählt. Sollte es sich bei den drei Ionen um ein Peptid in drei Modifikationszuständen (unmodifiziert, hydroxyliert und phosphoryliert) handeln, wäre es bei ausreichender Qualität der Spektren möglich, den Ort der Modifikation in der Sequenz genau zu lokalisieren.

Aus allen drei MS/MS-Messungen resultierten Spektren, in denen sich die y-Serie der Fragment-Ionen vollständig verfolgen ließ. Der Abstand zwischen zwei Fragment-Ionen einer Serie entspricht der Masse der jeweiligen Aminosäure in der Peptidsequenz. Bei dem  $[M+2H]^{2+}$ -Ion mit  $m/z = 504,27$  handelt es sich um ein Peptid mit der Sequenz ALGPFYPSR, einer Teilsequenz aus  $\alpha$ -Kristallin A, wie sie nach einer Trypsinspaltung zu erwarten ist (Abb. 3.16). Die MS/MS-Spektren der  $[M+2H]^{2+}$ -Ionen mit  $m/z = 512,27$  (Abb. 3.17) und  $m/z = 552,25$  (Abb. 3.18) zeigen trotz der abweichenden Masse der Vorläufer-Ionen dieselbe Aminosäuresequenz aus  $\alpha$ -Kristallin A wie das MS/MS-Spektrum von  $m/z = 504,27$ .

Die Massendifferenzen werden durch die Modifikationen der Aminosäureseitenketten hervorgerufen. Beim  $[M+2H]^{2+}$ -Ion mit  $m/z = 512,27$  ist ein Prolin durch ein Hydroxyprolin substituiert (ALG**Hyp**FYPSR) und im Falle des  $[M+2H]^{2+}$ -Ions mit  $m/z = 552,25$  ist ein Phosphohydroxyprolin in die Sequenz integriert (ALG**pHyp**FYPSR).

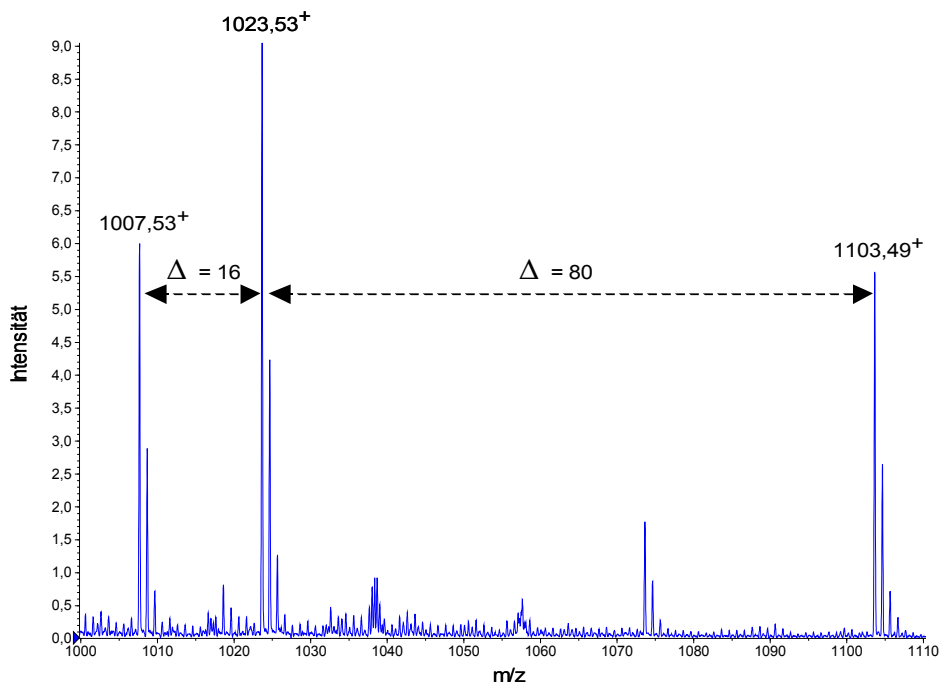
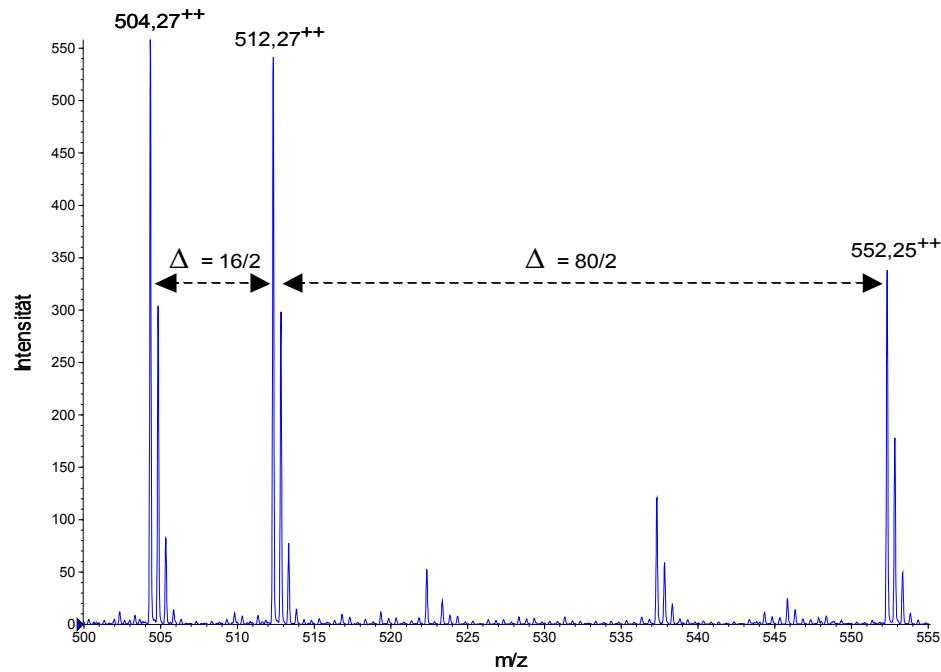


Abb. 3.15: Ausschnitte aus dem MS-Spektrum von  $\alpha$ -Kristallin A. A) zeigt die Signale der  $[M+2H]^{2+}$ -Ionen mit  $m/z = 504,27$ ,  $m/z = 512,27$  und  $m/z = 552,25$  und B) die Signale der  $[M+H]^+$ -Ionen mit  $m/z = 1007,53$ ,  $m/z = 1023,53$  und  $m/z = 1103,49$ . Die Massendifferenzen sind charakteristisch für die Hydroxylierung ( $\Delta = 8$  Da, bzw.  $\Delta = 16$  Da), bzw. Phosphorylierung ( $\Delta = 40$  Da, bzw.  $\Delta = 80$  Da) des Peptides.

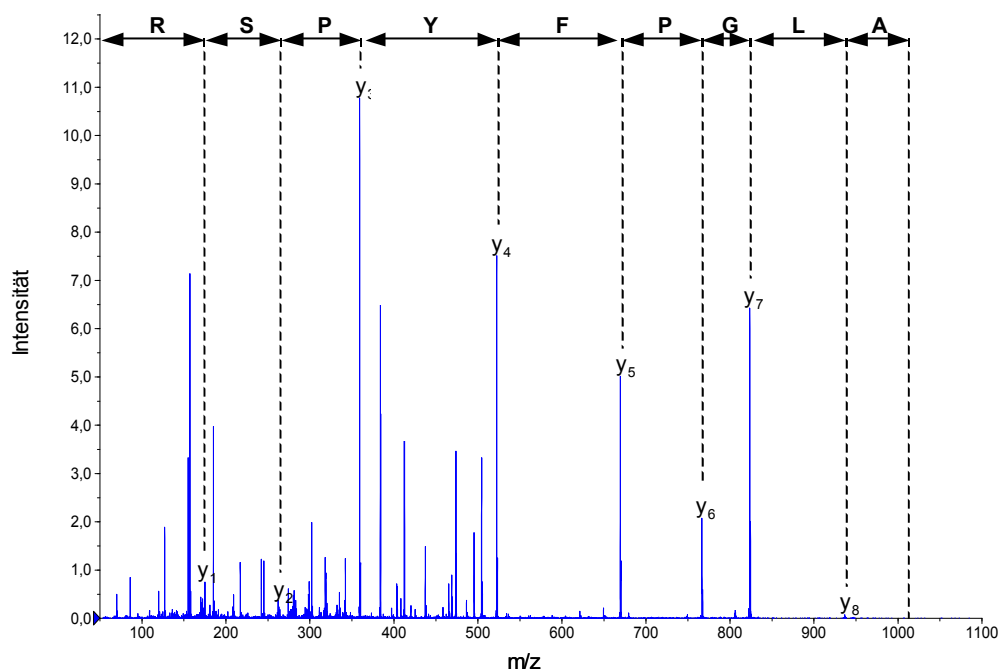


Abb. 3.16: MS/MS-Spektrum des  $[M+2H]^{2+}$ -Ions mit  $m/z = 504,27$ .

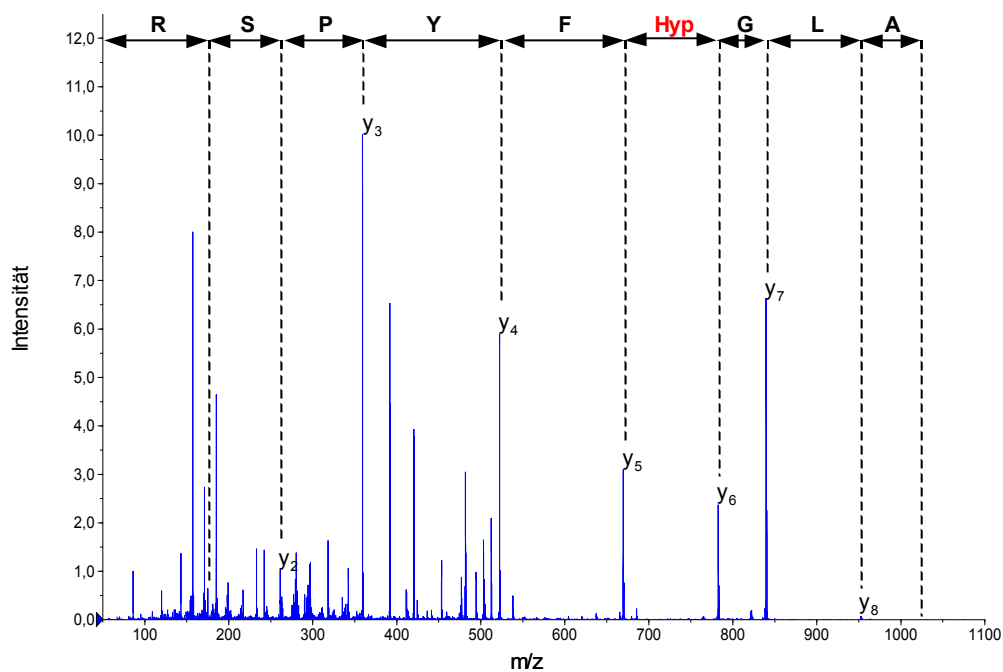


Abb. 3.17: MS/MS-Spektrum des  $[M+2H]^{2+}$ -Ions mit  $m/z = 512,27$ .

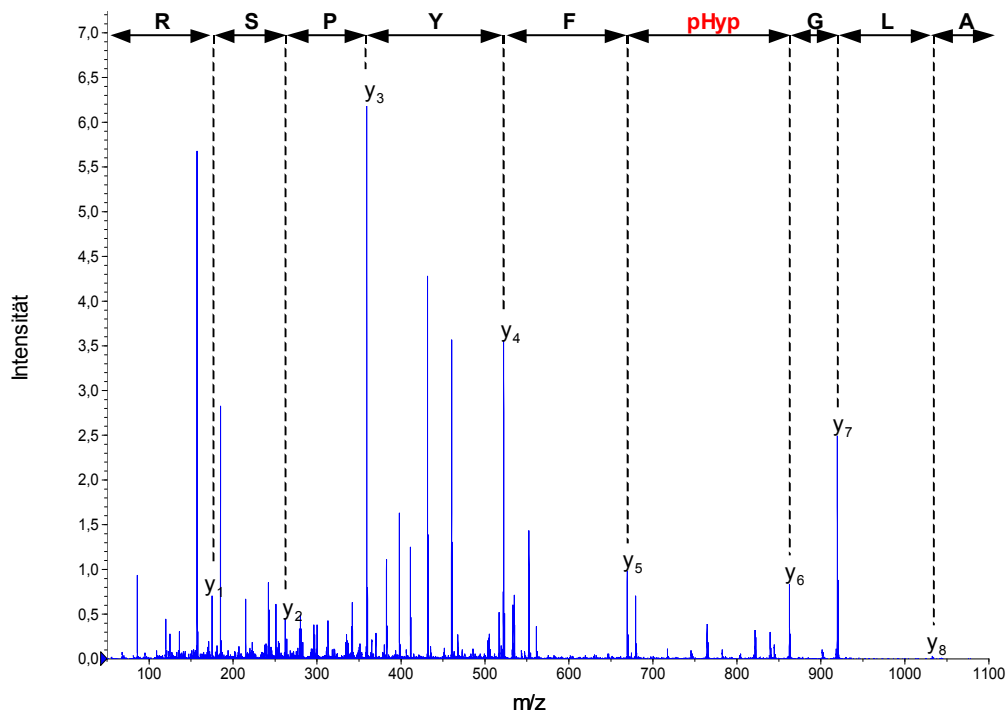


Abb. 3.18: MS/MS-Spektrum des  $[M+2H]^{2+}$ -Ions mit  $m/z = 552,25$ .

Die Sequenz von  $\alpha$ -Kristallin A (*Rattus norvegicus*) ist bekannt. Sie umfaßt insgesamt 173 Aminosäuren (NCBI-Datenbank gi|117369) und ist nachfolgend angegeben. Die Sequenz **ALGPFYPSR** entspricht den Aminosäuren 13 bis 21 der Sequenz. Sie sind im Fettdruck hervorgehoben. Das rote P zeigt die Position des Prolins, das auch in modifizierter Form als Hydroxyprolin und Phosphohydroxyprolin nachgewiesen werden konnte.

MDVTIQHPWFKR**ALGPFYPSR**LFDQFFGEGLFEYDLLPFLSSTISPYRQ  
SLFRTVLDSGISEVRSDDKDFVIFLDVKHFSPEDLTVKVLEDFVEIHGKH  
NERQDDHGYISREFHRRYRLPSNVDQSALSCSLADGMLTFSGPKVQSGL  
DAGHSERAI PVSREEKPSSAPSS

In den MS/MS-Spektren der drei Peptide ließ sich die vollständige y-Serie der Fragment-Ionen beobachten. Bei der y-Serie erfolgen die Fragmentierungen an den Peptidbindungen zwischen dem carboxyterminalen C-Atom und dem aminoterminalen N-Atom. Die Vollständigkeit der y-Serie in den MS/MS-Spektren erleichterte den direkten Vergleich der drei Peptidsequenzen.

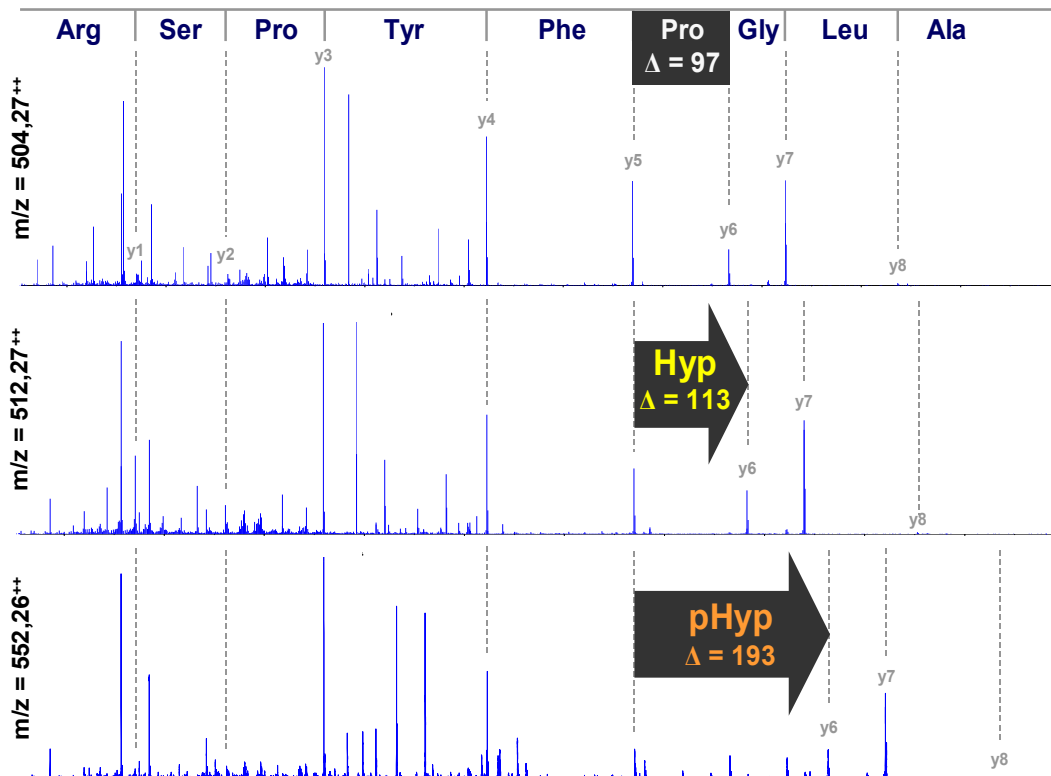


Abb. 3.19: Vergleich der drei MS/MS-Spektren der Peptide mit  $m/z = 504,27$ ,  $m/z = 512,27$  und  $m/z = 552,25$ . Gezeigt ist die Massenverschiebung in der y-Serie, verursacht durch die Modifikation des Prolins (zu Hydroxyprolin), bzw. Hydroxyprolins (zu Phosphohydroxyprolin).

Die Fragment-Ionen  $y_1$  bis einschließlich  $y_5$  sind bei den drei Peptiden identisch. Die posttranslationale Modifikation des Prolins zeigt sich in den jeweiligen Massendifferenzen zwischen den Fragment-Ionen  $y_5$  und  $y_6$ . Die auf das  $y_6$ -Ion nachfolgenden Fragment-Ionen verschieben sich entsprechend zu höheren  $m/z$ -Werten (Abb. 3.19).

Die nachgewiesenen Massenverschiebungen zur unmodifizierten Sequenz belegen sowohl die Hydroxylierung als auch die Phosphorylierung des Prolins in der Sequenz von  $\alpha$ -Kristallin A. Dies ist die erste Identifizierung von Phosphohydroxyprolin in der Sequenz eines Proteins. Das Protein  $\alpha$ -Kristallin A lag in dieser Gewebeprobe parallel in drei unterschiedlichen Strukturzuständen vor, die sich an einer einzigen Sequenzposition durch posttranslationale Modifikationen manifestiert haben müssen.

An den Meßergebnissen ist außerdem die hohe Signalintensität der modifizierten Peptide im Verhältnis zu dem Peptid mit nicht modifizierter Sequenz bemerkenswert. Das heißt, daß zumindest in dieser Probe der Anteil der modifizierten Sequenz in ähnlicher Größenordnung vorkam wie die nicht modifizierte Sequenz.

Alleine die hier nachgewiesene Modifikation des Prolins über Hydroxyprolin zu Phosphohydroxyprolin illustriert die Bandbreite der Variationsmöglichkeiten, die sich durch die posttranslationalen Modifikationen von Proteinen ergibt.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Phosphohydroxyprolin ist eine proteinogene Aminosäure

Phosphohydroxyprolin konnte im Rahmen der Untersuchungen zu dieser Arbeit erstmalig als proteinogene Aminosäure nachgewiesen und seine exakte Position in der Sequenz des Proteins  $\alpha$ -Kristallin A massenspektrometrisch identifiziert werden.

Bei Phosphohydroxyprolin handelt es sich um die Modifikation der Aminosäure, genauer der Iminosäure Hydroxyprolin, die ihrerseits erst durch posttranslationale Modifikation von Prolin entsteht. Das Prolin wird also zuerst durch eine Hydroxylase zum Hydroxyprolin modifiziert und nachfolgend durch einen noch nicht bekannten Mechanismus weiter zu Phosphohydroxyprolin umgewandelt. Auch das Vorkommen von Hydroxyprolin in  $\alpha$ -Kristallin A war bisher unbekannt. Neben dem  $\alpha$ -Kristallin A mit Prolin in der Sequenz, konnte sowohl die einfach modifizierte Variante mit Hydroxyprolin als auch die weitermodifizierte Variante mit Phosphohydroxyprolin nachgewiesen werden.

Darüber hinaus fanden sich noch Hinweise auf Phosphohydroxyprolin in einem weiteren Protein, Kollagen VIII. Diese Hinweise beruhen sowohl auf der Detektion mit einem Phosphohydroxyprolin-spezifischen polyklonalen Antikörper, als auch auf einer massenspektrometrischen Phosphoaminosäureanalyse nach partieller Hydrolyse des Kollagens. Eine Bestätigung auf der Ebene der Proteinsequenz und damit auch die genaue Lokalisierung des Phosphohydroxyprolins in der Kollagensequenz war in diesem Fall aber nicht möglich, da die besondere Primär- und Sekundärstruktur des Kollagens eine massenspektrometrische Sequenzierung weitgehend unmöglich macht.

Nach der Identifizierung von proteinogenem Phosphohydroxyprolin stellt sich die Frage nach Funktion und Bedeutung der posttranslationalen Phosphorylierung von Hydroxyprolin.

Die Proteinphosphorylierung ist ein ubiquitärer zellulärer Prozeß, der die Struktur und damit auch die Eigenschaften eines Proteins verändert. Sie ist deshalb weit mehr als bloße Dekoration. Sie kann bei einem Protein dessen Aktivitätsstatus und Funktion bestimmen, indem die Interaktion mit Proteinen und auch anderen Makromolekülen unmittelbar beeinflußt wird. Trotz ihrer großen Bedeutung ist aber (1) bei vielen Proteinphosphorylierungen die genaue Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt, (2) sind einige zwar bekannt, aber noch nicht eingehender untersucht, und (3) einige wenige, „exotischere“ Möglichkeiten bisher noch kaum oder gar nicht bekannt. In die letztgenannte Gruppe ist auch die Phosphorylierung des Hydroxyprolins einzuordnen.

Überhaupt finden sich bisher in nur zwei Publikationen Hinweise auf Phosphohydroxyprolin als proteinogene Aminosäure [14, 30]. Eine Sequenzposition fehlte bisher noch völlig. Für die geringe Präsenz von Phosphohydroxyprolin in der Reihe der bekannten Phosphohydroxyaminosäuren oder *O*-Phosphate lassen sich verschiedene biologische und auch methodologische Gründe anführen. So ist in der überwiegenden Zahl der Fälle das unphosphorylierte Protein wesentlich häufiger als sein phosphoryliertes Gegenstück. Neueren Schätzungen zufolge kommen rund 30% bis 50% der Proteine einer eukaryontischen Zelle irgendwann während ihrer Lebensdauer als Phosphoprotein vor, aber nur 1-2% dieser fakultativen Phosphoproteine sind zu einem distinkten Zeitpunkt phosphoryliert [76]. Zudem sind die Phosphohydroxyaminosäuren nicht alle gleich häufig: Phosphoserin und Phosphothreonin kommen deutlich häufiger vor als etwa Phosphotyrosin. Auch Phosphohydroxyprolin dürfte eher selten vorkommen, schon alleine deshalb, weil die Hydroxylierung eines Prolinrests die Voraussetzung seiner Existenz ist. Dieser besondere Umstand macht Phosphohydroxyprolin auch aus methodologischer Sicht zu einer Herausforderung, denn die Identifizierung und Lokalisation einer Phosphorylierungsstelle erfolgt ganz überwiegend durch massenspektrometrische Analyse. Hier ist bei der Sequenzierung einer unbekannten Proteinsequenz mit eventuell sogar noch unbekannten Gensequenz als Vergleichsmöglichkeit die Gefahr einer Verwechslung von Hydroxyprolin mit den nahezu massengleichen Aminosäuren Isoleucin und Leucin gegeben. Weiterhin berücksichtigen die gängigen Algorithmen zur Sequenzdatenbankrecherche zwar die Möglichkeit der Hydroxylierung eines Prolinrests, nicht aber die nachgeordnete Phosphorylierung des Hydroxyprolins. Bedenkt man dann noch, daß phosphorylierte Proteine bzw.

Phosphopeptide wegen ihrer zusätzlichen negativen Ladung bei der massenspektrometrischen Analyse oft diskriminiert werden, ist es nachvollziehbar, weshalb Phosphohydroxyprolin nicht viel früher oder häufiger in den Fokus der Proteinphosphorylierung geriet.

Phosphohydroxyprolin wurde bei allen vorangegangenen Untersuchungen zur Proteinphosphorylierung bisher keine Bedeutung beigemessen, bzw. blieb die Möglichkeit der Proteinphosphorylierung am Hydroxyprolinrest sogar weitgehend unberücksichtigt. Entsprechend liegen noch keinerlei Daten vor, die über die bloße Existenz des Phosphohydroxyprolins hinaus Auskunft geben könnten. Völlig ungeklärt ist deshalb noch die Bedeutung der Phosphorylierung von Hydroxyprolin, sowie wann und unter welchen Umständen dieser Prozeß stattfindet, wie häufig er ist, ob es sich um einen normalen physiologischen Vorgang handelt, oder ob er pathogener Natur ist und dergleichen mehr. Antworten hierauf werden erst künftige Untersuchungen liefern können, doch sollen im Nachfolgenden einige Aspekte diskutiert werden, die mit den noch offenen Fragen nach Funktion und Bedeutung in direktem Zusammenhang stehen könnten.

## 4.2 Konfiguration des nachgewiesenen Phosphohydroxyprolins

Sollte bei dem in  $\alpha$ -Kristallin A nachgewiesenen Phosphohydroxyprolin bzw. dem ihm zugrundeliegenden Hydroxyprolin die gleiche Hydroxylase für die Hydroxylierung des Prolinrests in Frage kommen, die auch in Kollagenen bestimmte Prolinreste hydroxyliert, dann muß aufgrund der Analogie davon ausgegangen werden, daß es sich im vorliegenden Fall um ein *trans*-3-Hydroxyprolin handelt. Das läßt jedenfalls die Stellung des betreffenden Prolins carboxyterminal von Glycin vermuten.

In Kollagenen ist *trans*-3-Hydroxyprolin die weitaus seltenere Variante gegenüber dem häufigeren *trans*-4-Hydroxyprolin. Während das Vorkommen von *trans*-4-Hydroxyprolin in Kollagen und auch noch einigen anderen Proteinen bekannt ist, hat man *trans*-3-Hydroxyprolin bisher ausschließlich in Kollagen nachgewiesen. Deshalb ist der Hinweis auf die *trans*-3-Konfiguration des Hydroxyprolins (und

damit auch des Phosphohydroxyprolins) in  $\alpha$ -Kristallin A ebenso ein Novum wie der Nachweis des Phosphohydroxyprolins als proteinogene Aminosäure.

Der Gehalt von *trans*-4-Hydroxyprolin weist oft nur relativ kleine Unterschiede in den verschiedenen Untergruppen des Kollagens einer Art auf, dagegen variiert der Gehalt von *trans*-3-Hydroxyprolin deutlich. In Kollagen kommt *trans*-4-Hydroxyprolin in der Yaa-Position der repetitiven [Gly-Xaa-Yaa]<sub>n</sub>-Sequenz mit einer Häufigkeit von rund 10% vor, der Gehalt von *trans*-3-Hydroxyprolin in Xaa-Position liegt unter 2%. Der Anteil von *trans*-3-Hydroxyprolin innerhalb eines Gewebes wird vom physiologischen oder pathologischen Zustand des Gewebes wesentlich beeinflusst. Das *trans*-4-Hydroxyprolin in der Yaa-Position kommt in Wirbeltieren nahezu ausschließlich N-terminal von Glycin vor, doch gibt es eine seltene Ausnahme von der Regel: In einigen Kollagenen und beim C1q-Protein des humanen Komplement-Systems findet sich *trans*-4-Hydroxyprolin auch N-terminal von Alanin [38].

Das Kollagen des Regenwurms unterscheidet sich grundsätzlich von dem der Wirbeltiere. So werden über 90% der Prolinreste in Kollagen zu *trans*-4-Hydroxyprolin modifiziert (bei Wirbeltieren sind es rund 50%) und es scheint, daß sämtliches *trans*-4-Hydroxyprolin des Regenwurmkollagens in der Xaa-Position der repetitiven [Gly-Xaa-Yaa]<sub>n</sub>-Sequenz vorliegt [77].

Beim Trematoden *Fasciola hepatica* fand man *trans*-3-Hydroxyprolin in verschiedenen Sequenzen (Val-3Hyp-Asp, Val-3Hyp-Glu und Tyr-3Hyp-Tyr) einer Cathepsin L-ähnlichen Proteinase. Da diese Sequenzen keinerlei Ähnlichkeit zu den Kollagensequenzen aufweisen, dürfte sich die Prolyl-3-Hydroxylase dieses Parasiten grundsätzlich von der Prolyl-3-Hydroxylase für das Kollagen der Wirbeltiere unterscheiden [78].

Die aufgeführten Beispiele unterstreichen die Vielfalt der Sequenzumgebungen, in denen posttranslationale Hydroxylierung am Prolin möglich ist. Hydroxyprolin dürfte in keinem anderen Protein häufiger vorkommen als in Kollagen, doch belegen zahlreiche Beispiele, daß Hydroxyprolin auch in anderen Proteinen präsent ist. Die Entdeckung der Hydroxyprolinreste abseits von Kollagen erfolgte oft nicht zielgerichtet, sondern war zumeist eher zufälliger Natur. Man kann deshalb

davon ausgehen, daß in Zukunft noch weitere Hydroxyprolinpositionen in anderen Proteinen gefunden werden, womit auch die Möglichkeit der Identifizierung von weiterem proteinogenem Phosphohydroxyprolin zunehmen dürfte.

### **4.3 Phosphohydroxyprolin-spezifische polyklonale Antikörper**

Hilfreich für die Entdeckung weiterer Phosphohydroxyprolinreste in Proteinen ist eine geeignete Methode zum Screening. Die Methode der Wahl ist hierbei der immunologische Nachweis mittels spezifischer Antikörper nach einem Western Blot. Spezifische Antikörper gegen Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin wurden bereits vielfach beschrieben. Wie schon in der Einleitung dargelegt wurde, gibt es keine bekannten Antikörper gegen Phosphoserin und Phosphothreonin, welche die phosphorylierte Aminosäureseitenkette gänzlich unabhängig von der Sequenzumgebung zuverlässig erkennen. Im Gegensatz dazu erlaubt die größere Phosphotyrosinseitenkette mit dem aromatischen Ring sehr wohl die Generierung seitenkettenspezifischer Antikörper. Die vorliegende Arbeit zeigt nun, daß auch die Generierung von Antikörpern (polyklonal) möglich ist, die spezifisch und unabhängig von der Sequenzumgebung die Seitenkette von Phosphohydroxyprolin erkennen. Insofern liegt die weiterführende Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers gegen Phosphohydroxyprolin im Bereich des Möglichen. Damit stünde dann ein sensitives Werkzeug zum globalen Screening nach Phosphohydroxyprolin zur Verfügung.

### **4.4 Möglichkeiten der Phosphorylierung von Hydroxyprolin**

#### **4.4.1 Phosphorylierung des Hydroxyprolins durch Proteinkinasen**

Die Phosphorylierung von Proteinen erfolgt in den meisten Fällen durch Proteinkinasen. Dabei wird die  $\gamma$ -Phosphoryl-Gruppe von einem Nukleosid-Triphosphat (z.B. ATP) auf die Aminosäureseitenkette einer Aminosäure transferiert. Die positionelle Dephosphorylierung wird durch Proteinphosphatasen katalysiert.

Ein bemerkenswertes Ergebnis sowohl der schon weitgehend abgeschlossenen als auch der noch andauernden Sequenzierprojekte der letzten Jahre ist der hohe Anteil von Proteinkinase- und Proteinphosphatasegenen am jeweiligen Genom. So wurden im Genom von *C. elegans* mit 19.000 Genen rund 400 für Proteinkinasen kodierende Sequenzen gefunden [79]. Für das humane Genom mit rund 25.000 Genen wurden mehr als 1100 Proteinkinasegene geschätzt [80]. Die vorangestellten Zahlen gelten allein für die bekannten Konsensussequenzen der Serin-/Tyrosin-Proteinkinasesuperfamilie. Die weniger bekannten Proteinkinasen mit distinkten Sequenzen für die katalytische Domäne sind dabei noch gar nicht berücksichtigt. Es darf davon ausgegangen werden, daß noch etliche Proteinkinasen ihrer Entdeckung harren. Gleiches gilt für die Proteinphosphatasen – hier gibt es Hinweise, die ein Verhältnis von eins zu eins zwischen Kinasen und Phosphatasen nahelegen [81].

Im Fall des in  $\alpha$ -Kristallin A nachgewiesenen Phosphohydroxyprolins ist eine Phosphorylierung des Hydroxyprolins durch eine noch nicht bekannte Hydroxyprolin-spezifische Proteinkinase denkbar, es kann aber auch die Möglichkeit einer unspezifischen Phosphatübertragung durch eine Proteinkinase, die spezifisch für ein anderes Substrat ist, nicht ausgeschlossen werden.

Bei früheren Untersuchungen zur Substratspezifität einer cAMP-abhängigen Proteinkinase [15, 29] und einer Myosin-Light-Chain-Kinase (MLC-Kinase) [28] wurden die kinetischen Parameter der Phosphorylierung verschiedener synthetischer Peptidanaloga analysiert. Deren Sequenz unterschied sich in der Wahl der potentiell zu phosphorylierenden Hydroxyaminosäure. Dabei zeigte sich, daß die beiden untersuchten Serin-spezifischen Proteinkinasen neben dem Peptid mit einem Serinrest auch solche mit einem Threoninrest oder einem Hydroxyprolinrest phosphorylieren konnten. Zwar erfolgte die enzymatische Übertragung des Phosphats auf Hydroxyprolin deutlich langsamer und weniger effektiv als dies bei Threonin oder Serin der Fall war, doch zeigten diese Arbeiten die prinzipielle Möglichkeit der Phosphorylierung von Hydroxyprolin durch Serin-spezifische Proteinkinasen. Ein Peptidanalogen mit einem isomeren D-Serin konnte hingegen nicht auf diese Weise phosphoryliert werden [28]. Darüber hinaus wurde auch die Phosphorylierbarkeit der beiden Stereoisomere *trans*-4-Hydroxyprolin und *cis*-4-Hydroxyprolin verglichen. Das Ergebnis zeigte, daß sich *cis*-4-Hydroxyprolin im

Gegensatz zum *trans*-4-Hydroxyprolin weder durch die cAMP-abhängige Proteinkinase noch durch die MLC-Kinase phosphorylieren ließ [28].

Andere Untersuchungen zeigten die Bedeutung der Sequenzumgebung des zu phosphorylierenden Aminosäurerests für die Kinetik der Phosphatübertragung durch die MLC-Kinase [82]. Eine N-terminale Ansammlung basischer Aminosäuren in definiertem Abstand zum Ort der Phosphorylierung war dabei entscheidend. Am günstigsten für die Phosphatübertragung durch die MLC-Kinase erwies sich die Sequenz Lys<sub>11</sub>-Lys<sub>12</sub>-Arg<sub>13</sub>-Xaa<sub>14</sub>-Xaa<sub>15</sub>-Arg<sub>16</sub>-Xaa<sub>17</sub>-Xaa<sub>18</sub>-Ser<sub>19</sub>; Ser<sub>19</sub> war hierbei das Ziel der Phosphatübertragung.

Auch in der  $\alpha$ -Kristallin A-Sequenz finden sich N-terminal nahe dem nachgewiesenen Phosphohydroxyprolin (pHyp<sub>16</sub>) die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin: Lys<sub>11</sub>-Arg<sub>12</sub>-Ala<sub>13</sub>-Leu<sub>14</sub>-Gly<sub>15</sub>-pHyp<sub>16</sub>. Ähnlich wie bei der MLC-Kinase könnte das N-terminale Cluster basischer Aminosäuren eine Voraussetzung für die Phosphorylierung des Hydroxyprolinrestes sein. In der  $\alpha$ -Kristallin A-Sequenz gibt es noch ein weiteres Glycin-Prolin-Sequenzmotiv (Gly<sub>143</sub>-Pro<sub>144</sub>); hier findet sich N-terminal aber keine basische Aminosäure in relativer Nähe zum Prolin<sub>144</sub>. Bei der Untersuchung des  $\alpha$ -Kristallins A konnten keine Modifikationen des Prolins<sub>144</sub> nachgewiesen werden.

#### 4.4.2 Phosphorylierung durch Inositol-Pyrophosphat

Andere Untersuchungen der letzten Jahre haben noch einen alternativen Weg zur Proteinphosphorylierung gezeigt, der ohne die Beteiligung eines phosphatübertragenden Enzyms auskommt [83]. Die Schlüsselmoleküle hierzu sind Inositolpyrophosphate. Sie erfüllen diverse biologische Funktionen, die zum Teil gut charakterisiert sind. Beispielsweise vermittelt Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) die Freisetzung intrazellulärer Calciumspeicher [84] und die Inositolpyrophosphate Diphosphoinositolpentakisphosphat (5PP-IP<sub>5</sub> oder IP<sub>7</sub>) und Bis-Diphosphoinosiltetrakisphosphat ([PP]<sub>2</sub>-IP<sub>4</sub> oder IP<sub>8</sub>) sind u.a. an der Regulation von Endozytose [85], Chemotaxis [86] und Apoptose [87] beteiligt. Bei den Säugern werden Inositolpyrophosphate, wie IP<sub>7</sub> und IP<sub>8</sub> von einer Familie dreier hochkonzentrierter Inositolhexakisphosphat-(IP<sub>6</sub>)-Kinasen (IP6Ks) gebildet [88, 89].

Inositolpyrophosphate enthalten besonders energiereiche Pyrophosphatbindungen. Die bei der Hydrolyse der Pyrophosphatbindung in  $\text{IP}_7$  freigesetzte Energie beträgt 6,6 kcal/mol [84]. Der Wert liegt damit zwischen dem der freien Standardenergie von Adenosin-5'-diphosphat (ADP) (6,4 kcal/mol) und Adenosin-5'-triphosphat (ATP) (7,3 kcal/mol). Die sterischen Vorgaben und die elektrostatische Abstoßung der benachbarten Pyrophosphate der beiden physiologischen  $\text{IP}_8$ -Isomere (4,5)[PP]<sub>2</sub>- $\text{IP}_4$  und (5,6)[PP]<sub>2</sub>- $\text{IP}_4$  weisen auf eine noch deutlich höhere freie Standardenergie hin, als sie für  $\text{IP}_7$  ermittelt wurde [90]. Die hohe freie Standardenergie der Inositolpyrophosphate ist ein wichtiges Indiz für deren Funktion als Phosphat-Donor. Tatsächlich konnte die Phosphorylierung verschiedener eukaryotischer Proteine durch  $\text{IP}_7$  experimentell bestätigt werden [83]. Für die Übertragung des Phosphats scheint kein Enzym erforderlich zu sein. Bisher ist für diese Form nichtenzymatischer Phosphorylierung lediglich die Übertragung von Phosphat auf Serin gezeigt worden, doch kann nicht ausgeschlossen werden, daß dieser alternative Weg auch die Phosphorylierung anderer Hydroxyaminosäuren ermöglicht.

## 4.5 Mögliche Funktion von Phosphohydroxyprolin

### 4.5.1 Phosphohydroxyprolin in Kollagen VIII

Das Sequenzmotif Gly-Pro-Hyp ist die häufigste Tripeptidabfolge in Kollagenen. Zugleich ist es die Sequenz, welche die Kollagenhelix am besten stabilisiert. Wenn an Stelle von Pro und Hyp andere Aminosäuren in der Sequenz vorkommen, beeinflußt dies einerseits die Stabilität der Helix, andererseits ermöglicht dies erst die Bindung von Kollagen an andere Proteine und Proteoglykane der Extrazellulärmatrix, da die Bindungen über die elektrostatischen und/oder hydrophoben Wechselwirkungen der Aminosäureseitenketten erfolgen [91]. In diesem Zusammenhang nimmt Phosphohydroxyprolin eine Sonderstellung ein, ist es doch die einzige Aminosäure, die getreu dem Gly-Pro-Hyp-Motif die Stabilität der Kollagenhelix gewährleistet und gleichzeitig eine negative Ladung an exponierter Stelle für elektrostatische Interaktion zur Verfügung stellt. Möglicherweise ist dieser besondere Umstand auch bei Kollagen VIII wichtig. In der Descemet-

Membran, der Basalmembran der Augenhornhaut (Cornea), bildet hexagonal vernetztes Kollagen VIII das Gewebegrundgerüst [92]. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen an den Verbindungsstellen hantelförmige Verknüpfungen der Kollagenstränge. Diskutiert wird eine Beteiligung anderer Makromoleküle an diesen Knotenstellen des Kollagennetzes [93]. Sowohl bei der direkten Verknüpfung der Kollagenstränge untereinander als auch bei Einbeziehung eines weiteren Makromoleküls ist eine Beteiligung von Phosphohydroxyprolin denkbar.

#### 4.5.2 Phosphohydroxyprolin in $\alpha$ -Kristallin A

Die Eiweißkomponenten der Augenlinse zeigen ein ungewöhnlich hohes Maß an Stabilität. Die Proteine der Kristallinfamilie unterliegen während der gesamten Lebensdauer keinem Turnover und beschränken dadurch Linsentrübungen auf ein Minimum. Verantwortlich für diese Tatsache sind (i) die räumliche Ordnung der Proteine bei der gegebenen hohen Proteinkonzentration, (ii) die hohe intrinsische Stabilität der ubiquitären und Species-spezifischen Kristalline und (iii) die Chaperon-Eigenschaften der  $\alpha$ -Kristalline.

Während die  $\beta/\gamma$ -Kristalline eine rein strukturbildende Funktion zu übernehmen scheinen, nimmt man an, daß Komplexe aus  $\alpha$ -Kristallin A und  $\alpha$ -Kristallin B beschädigte Proteine vor Aggregation und Präzipitation bewahren. Untersuchungen an  $\alpha$ -Kristallin A  $-/-$  Mäusen haben ergeben, daß dieser Genotyp zur Etablierung eines Katarakt-artigen Phänotyps führt [94]. Den  $\alpha$ -Kristallinen allgemein wird eine Chaperon-artige Funktion zugesprochen [95, 96, 97, 98]. Die  $\alpha$ -Kristalline werden daher auch in die Superfamilie der *small heat-shock proteins* (sHsp's) eingeordnet [99]. Die sHsp's binden an denaturierende Proteine (vermutlich im „molten globule state“) und verhindern dadurch deren Aggregation und Präzipitation. Es konnte gezeigt werden, daß  $\alpha$ -Kristalline *in vivo* als große oligomere Komplexe mit ca. 15-50 Untereinheiten vorliegen. Die Oligomerisierung ist offenbar wichtig für die Chaperon-Funktion [95]. Untersuchungen von Aquilina et al. und Ito et al. zeigen, daß die Phosphorylierung der  $\alpha$ -Kristallin-Komplexe sowohl mit einer Abnahme der Oligomergröße als auch einem Verlust der Chaperon-Aktivität einhergeht [97, 100]. Möglicherweise bewirkt auch die Phosphorylie-

rung des in  $\alpha$ -Kristallin A nachgewiesenen Hydroxyprolins eine ganz ähnliche Reaktion.

In den ausdifferenzierten Zellen der Augenlinse findet keine Proteinsynthese mehr statt, d.h. eine Erneuerung defekter Strukturen ist nicht möglich. Die Proteine der Augenlinse müssen deshalb die ganze Lebensspanne eines Organismus überdauern. Sie sind wegen ihrer langen Lebensdauer und der kontinuierlichen Exposition gegenüber einfallendem Sonnenlicht mit dem Alter zunehmend von Beschädigungen, wie z.B. Oxidation, Trunkierung und Denaturierung betroffen. Auch Phosphorylierungen nehmen bei den Proteinen der Augenlinse mit fortschreitender Alterung zu [98]. Dies führt zur Depolymerisierung der  $\alpha$ -Kristallin-Komplexe und damit zur Beeinträchtigung ihrer Chaperon-Funktion.

Im Fall von  $\alpha$ -Kristallin B ist auch eine Assoziation mit verschiedenen Proteinen des Cytoskeletts, wie z.B. Aktin, Tubulin und Desmin nachgewiesen und weitere Untersuchungen zeigten eine Assoziation mit den Intermediärfilamenten CP49 und Filensin in der Augenlinse [101]. Die Bedeutung für das Cytoskelett wird darin ersichtlich, daß Mutationen in  $\alpha$ -Kristallin B zu einem Zusammenbruch des Intermediärfilament-Netzwerkes führen können [102].

Man kann nun einen besonderen Mechanismus postulieren, bei dem die Phosphorylierung als molekulares Signal wirkt, das zwischen der „normalen“ Chaperon-Funktion und einer besonderen Schutzfunktion für das Cytoskelett vermittelt. Bei einer starken Beschädigung des Cytoskeletts würde die Phosphorylierung zur Freisetzung von zusätzlichem  $\alpha$ -Kristallin B aus den  $\alpha$ -A-/ $\alpha$ -B-Komplexen führen. Dann würde das  $\alpha$ -Kristallin B zur Bindung an Proteine des Cytoskeletts zur Verfügung stehen und verhindert dadurch möglicherweise die Zerstörung der Zelle (Abb. 4.1).

Inwieweit die bislang schon nachgewiesenen Phosphorylierungen von  $\alpha$ -Kristallin A an diesem Modell im Einzelnen beteiligt sind, ist unbekannt. Möglicherweise spielt die Gesamtphosphorylierung des Proteins eine Rolle. Die in dieser Arbeit gezeigte Phosphorylierung des Hydroxyprolins in  $\alpha$ -Kristallin A könnte an diesem Mechanismus beteiligt sein.

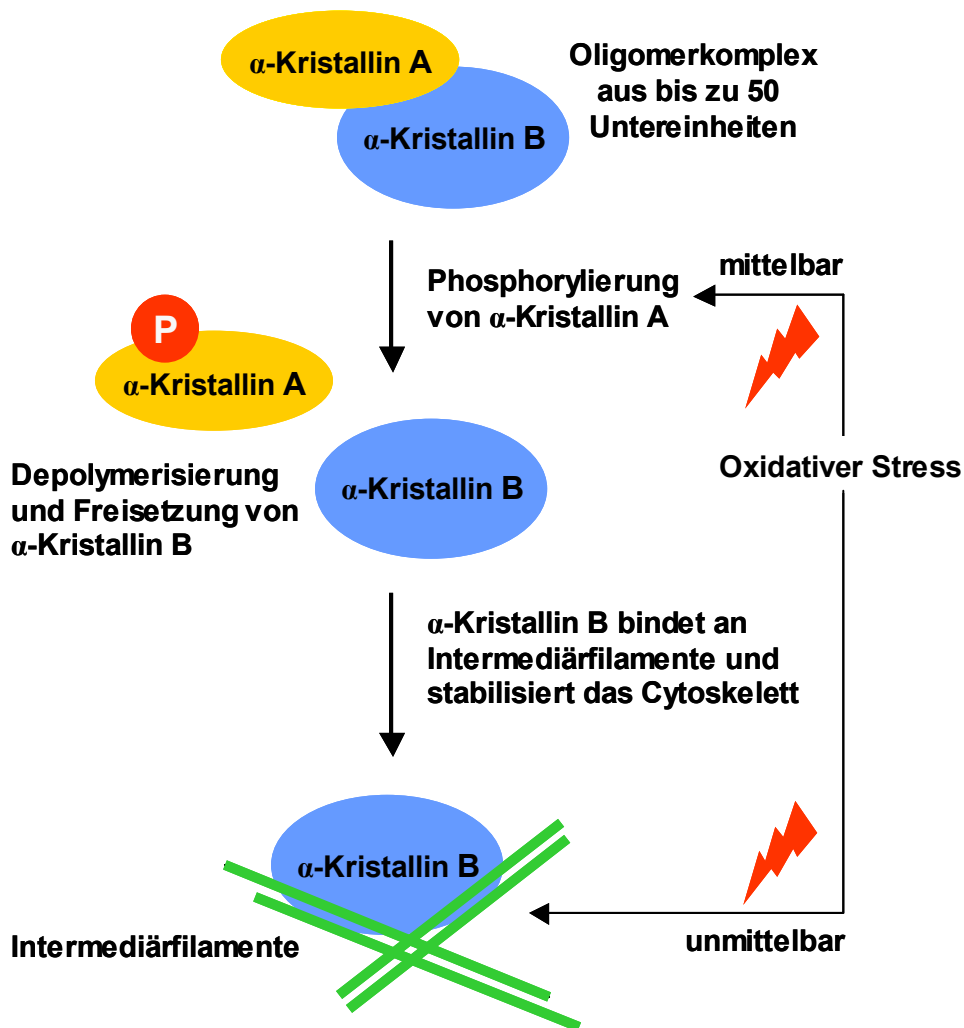


Abb. 4.1: Mögliche Folgen der Phosphorylierung von  $\alpha$ -Kristallin A.

Neben dem Phosphohydroxyprolin in  $\alpha$ -Kristallin A aus der Augenlinse konnte Phosphohydroxyprolin auch noch in  $\alpha$ -Kristallin A aus dem Herzgewebe nachgewiesen werden [103]. Es handelt sich um die gleiche Sequenzposition, an der das Phosphohydroxyprolin schon im Gewebe der Augenlinse nachgewiesen wurde.

Das Auftreten von pHyp an gleicher Sequenzposition in unterschiedlichen Geweben (in  $\alpha$ -Kristallin A der Augenlinse und des Herzens) deutet auf eine gewebe-unabhängige Funktion hin. Das Vorkommen von pHyp in Kristallinen und auch in Kollagenen, beides sehr langlebige Proteine mit Strukturfunktion, läßt vermuten,

daß der Phosphoester des Hydroxyprolins kein kurzfristiges Intermediat ist, sondern daß es sich um eine dauerhaft angelegte Modifikation der Seitenkette handelt. Diese Vermutung wird auch gestützt durch die Beobachtung, daß während einer sechstündigen Inkubation einer geeigneten Zellkultur mit radioaktivem Phosphat kein Einbau in proteinogenes Hydroxyprolin erfolgte (Kapitel 3.1.2).

Eine Funktion des nachgewiesenen Phosphohydroxyprolins als kurzfristiger Energiespeicher oder als kurzfristiges, reversibles Signal einer Signalkaskade kann damit weitgehend ausgeschlossen werden. Wahrscheinlicher ist deshalb eine Funktion als längerfristig angelegtes Strukturelement in der Sequenz des betreffenden Proteins.

#### **4.6 Ausblick**

Mit der Identifizierung von Phosphohydroxyprolin in  $\alpha$ -Kristallin A und Kollagen VIII ist das Fundament gelegt, auf dessen Grundlage weitere Untersuchungen zur Verbreitung und Funktion der Phosphorylierung von Hydroxyprolin vorgenommen werden können. Dazu ist es notwendig, weitere Sequenzpositionen von Phosphohydroxyprolin zu identifizieren.

Es gibt kaum Anhaltspunkte, wie häufig und wie weit verbreitet Phosphohydroxyprolin in Proteinen ist. Die wenigen konkreten Hinweise, die bisher vorliegen, deuten aber auf ein weit verbreitetes Vorkommen von Phosphohydroxyprolin hin. Allein der Umstand, daß sich Phosphohydroxyprolin in  $\alpha$ -Kristallin A sowohl in der Augenlinse als auch im Herzgewebe der Ratte nachweisen läßt und zudem auch noch in Kollagen VIII aus humaner Herkunft ebenfalls Indizien auf Phosphohydroxyprolin hinweisen, läßt den Schluß zu, daß ein Vorkommen in allen Säugetieren wahrscheinlich ist. Hinweise auf Phosphohydroxyprolin wurden von Poulsen et al. außerdem auch in natSil-2 gefunden [30], einem Protein, das in Kieselalgen (Diatomeen) an der Silicatbildung beteiligt ist. Diatomeen sind photosynthetisch lebende Protisten. Vermutlich ist Phosphohydroxyprolin aber auch in den phylogenetisch höher entwickelten Taxa des Pflanzenreichs zu finden.

Hilfreich für die Identifizierung weiterer Phosphohydroxyprolinpositionen wäre eine möglichst vollständige Sequenzabdeckung in Frage kommender Proteine mittels massenspektrometrischer Analyse. Solche Analysen tangieren mitunter die heutigen Grenzen der methodischen Machbarkeit. Hier können Effekte wie Signalunterdrückung das Aufspüren komplexer Modifikationen an der Aminosäureseitenkette beeinträchtigen. Um solche störenden Effekte möglichst auszuschließen, sind weitere der MS-Analyse vorausgehende Maßnahmen zur Reduzierung der Probenkomplexität, ratsam, bzw. solche Maßnahmen, die zur gezielten Anreicherung der Phosphohydroxyprolin enthaltenden Proben dienen, da zu erwarten ist, daß der jeweilige Anteil Phosphohydroxyprolin-haltiger Proteine klein ist gegenüber der nichtphosphorylierten Variante.

Allgemein bietet sich zur Anreicherung von Phosphopeptiden die Verwendung einer immobilisierten Metall-Ionen-Affinitätschromatographie (IMAC) an, bzw. die Anreicherung der Phosphopeptide auf speziellen Oberflächen, deren Mechanismus auf der IMAC-Technik beruht. Doch ist die Methode nur eingeschränkt zu empfehlen, da sie nach eigener Erfahrung nur eingeschränkt reproduzierbare Ergebnisse lieferte. Die affinitätschromatographische Trennung mittels pH-spezifischer Antikörper könnte eine alternative Methode zur hochspezifischen Anreicherung Phosphohydroxyprolin-haltiger Proteine sein. Ergänzend kann eine anschließende 2D-Elektrophorese zur weiteren Isolierung der in Frage kommenden Proteine beitragen. Eine den jeweiligen Gegebenheiten angepaßte Kombination der angeführten Verfahren sowie die Einbeziehung von ESI-MS und MALDI-MS zur Sequenzanalyse sollte die Identifizierung von weiterem Phosphohydroxyprolin in Proteinen ermöglichen.

Mit zunehmender Kenntnis der Möglichkeit der Phosphorylierung von proteino-genem Hydroxyprolin könnte in Zukunft Phosphohydroxyprolin ebenso alltägliches Objekt der Forschung sein, wie es heute schon bei den allgemein bekannten posttranslational modifizierten Aminosäuren Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin der Fall ist.

## 5 LITERATUR

- [1] Chambers, I.; Frampton, J.; Goldfarb, P.; Affara, N.; McBain, W.; Harrison, P. R.: The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *Embo J*, 1986, 5: 1221-1227.
- [2] Zinoni, F.; Birkmann, A.; Stadtman, T. C.; Bock, A.: Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 4650-4654.
- [3] Srinivasan, G.; James, C. M.; Krzycki, J. A.: Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science*, 2002, 296: 1459-1462.
- [4] Hao, B.; Gong, W.; Ferguson, T. K.; James, C. M.; Krzycki, J. A.; Chan, M. K.: A new UAG-encoded residue in the structure of a methanogen methyltransferase. *Science*, 2002, 296: 1462-1466.
- [5] Hubbard, M. J.; Cohen, P.: On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci*, 1993, 18: 172-177.
- [6] Herzig, S.; Neumann, J.: Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev*, 2000, 80: 173-210.
- [7] Francis, S. H.; Corbin, J. D.: Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu Rev Physiol*, 1994, 56: 237-272.
- [8] Fantl, W. J.; Johnson, D. E.; Williams, L. T.: Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*, 1993, 62: 453-481.

- [9] Schrecker, O.; Stein, R.; Hengstenberg, W.; Gassner, M.; Stehlik, D.: The staphylococcal PEP dependent phosphotransferase system, proton magnetic resonance (PMR) studies on the phosphoryl carrier protein HPr: evidence for a phosphohistidine residue in the intact phospho-HPr molecule. *FEBS Lett*, 1975, 51: 309-312.
- [10] Pas, H. H.; Robillard, G. T.: S-phosphocysteine and phosphohistidine are intermediates in the phosphoenolpyruvate-dependent mannitol transport catalyzed by *Escherichia coli* EIIMtl. *Biochemistry*, 1988, 27: 5835-5839.
- [11] Sanders, D. A.; Gillece-Castro, B. L.; Stock, A. M.; Burlingame, A. L.; Koshland, D. E. Jr.: Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY. *J Biol Chem*, 1989, 264: 21770-21778.
- [12] Springer, M. S.; Goy, M. F.; Adler, J.: Protein methylation in behavioural control mechanisms and in signal transduction. *Nature*, 1979, 280: 279-284.
- [13] Martensen, T. M.: Chemical properties, isolation, and analysis of *O*-phosphates in proteins. *Methods Enzymol*, 1984, 107: 3-23.
- [14] Urushizaki, Y.; Seifter, S.: Phosphorylation of hydroxylysine residues in collagen synthesized by cultured aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 3091-3095.
- [15] Feramisco, J. R.; Kemp, B. E.; Krebs, E. G.: Phosphorylation of hydroxyproline in a synthetic peptide catalyzed by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 1979, 254: 6987-6990.
- [16] Kivirikko, K. I.; Pihlajaniemi, T.: Collagen hydroxylases and the protein disulfide isomerase subunit of prolyl 4-hydroxylases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 1998, 72: 325-398.

- [17] Kresina, T. F.; Miller, E. J.: Isolation and characterization of basement membrane collagen from human placental tissue. Evidence for the presence of two genetically distinct collagen chains. *Biochemistry*, 1979, 18: 3089-3097.
- [18] Knox, J. P.: The extracellular matrix in higher plants. 4. Developmentally regulated proteoglycans and glycoproteins of the plant cell surface. *Faseb J*, 1995, 9: 1004-1012.
- [19] Kieliszewski, M. J.; Lamport, D. T.: Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. *Plant J*, 1994, 5: 157-172.
- [20] Roberts, K.; Grief, C.; Hills, G. J.; Shaw, P. J.: Cell wall glycoproteins: structure and function. *J Cell Sci Suppl*, 1985, 2: 105-127.
- [21] Teng-umnuay, P.; Morris, H. R.; Dell, A.; Panico, M.; Paxton, T.; West, C. M.: The cytoplasmic F-box binding protein SKP1 contains a novel pentasaccharide linked to hydroxyproline in Dictyostelium. *J Biol Chem*, 1998, 273: 18242-18249.
- [22] Hart, G. W.; Kreppel, L. K.; Comer, F. I.; Arnold, C. S.; Snow, D. M.; Ye, Z.; Cheng, X.; DellaManna, D.; Caine, D. S.; Earles, B. J.; Akimoto, Y.; Cole, R. N.; Hayes, B. K.: O-GlcNAcylation of key nuclear and cytoskeletal proteins: reciprocity with O-phosphorylation and putative roles in protein multimerization. *Glycobiology*, 1996, 6: 711-716.
- [23] Gordon, A. H.: Occurrence of a phosphate ester of a hydroxyamino-acid. *Nature*, 1948, 162: 778.
- [24] Astrup, T.; Carlstrom, G.; Stage, A.: Free amino acids in mammalian tissue. *Acta Physiol Scand*, 1951, 24: 202-211.
- [25] Hiles, R. A.; Triebwasser, K. C.; Henderson, L. M.: The degradation of hydroxy-L-lysine in liver via its phosphate ester. *Biochem Biophys Res Commun*, 1970, 41: 662-668.

- [26] Hiles, R. A.; Willett, C. J.; Henderson, L. M.: Hydroxylysine metabolism in rats, mice, and chickens. *J Nutr*, 1972, 102: 195-203.
- [27] Hiles, R. A.; Henderson, L. M.: The partial purification and properties of hydroxylysine kinase from rat liver. *J Biol Chem*, 1972, 247: 646-651.
- [28] Pearson, R. B.; Floyd, D. M.; Hunt, J. T.; Lee, V. G.; Kemp, B. E.: Hydroxyamino acid specificity of smooth muscle myosin light chain kinase. *Arch Biochem Biophys*, 1988, 260: 37-44.
- [29] Prorok, M.; Sukumaran, D. K.; Lawrence, D. S.: The cyclic AMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle is a homoserine kinase. *J Biol Chem*, 1989, 264: 17727-17733.
- [30] Poulsen, N.; Sumper, M.; Kroger, N.: Biosilica formation in diatoms: characterization of native silaffin-2 and its role in silica morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 12075-12080.
- [31] Prockop, D. J.; Kivirikko, K. I.: Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem*, 1995, 64: 403-434.
- [32] Kuivaniemi, H.; Tromp, G.; Prockop, D. J.: Mutations in collagen genes: causes of rare and some common diseases in humans. *Faseb J*, 1991, 5: 2052-2060.
- [33] Ramshaw, J. A.; Shah, N. K.; Brodsky, B.: Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides. *J Struct Biol*, 1998, 122: 86-91.
- [34] Bansal, M.: Stereochemical restrictions on the occurrence of amino acid residues in the collagen structure. *Int J Pept Protein Res*, 1977, 9: 224-234.
- [35] Bansal, M.; Ramachandran, G. N.: A theoretical study of the structures of (Gly-Pro-Leu)<sub>n</sub> and (Gly-Leu-Pro)<sub>n</sub>. *Int J Pept Protein Res*, 1978, 11: 73-81.

- [36] Salem, G.; Traub, W.: Conformational implications of amino acid sequence regularities in collagen. *FEBS Lett*, 1975, 51: 94-99.
- [37] Berg, R. A.; Prockop, D. J.: The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen. *Biochem Biophys Res Commun*, 1973, 52: 115-120.
- [38] Kivirikko, K. I.; Pihlajaniemi, T.: Collagen hydroxylases and the protein disulfide isomerase subunit of prolyl 4-hydroxylases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 1998, 72: 325-398.
- [39] Bhat, S. P.: Crystallins, genes and cataract. *Prog Drug Res*, 2003, 60: 205-262.
- [40] MacCoss, M. J.; McDonald, W. H.; Saraf, A.; Sadygov, R.; Clark, J. M.; Tasto, J. J.; Gould, K. L.; Wolters, D.; Washburn, M.; Weiss, A.; Clark, J. I.; Yates, J. R., 3rd: Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 7900-7905.
- [41] Horwitz, J.: Alpha-crystallin. *Exp Eye Res*, 2003, 76: 145-153.
- [42] D'Alessio, G.: The evolution of monomeric and oligomeric betagamma-type crystallins. Facts and hypotheses. *Eur J Biochem*, 2002, 269: 3122-3130.
- [43] Duclos, B.; Marcandier, S.; Cozzzone, A. J.: Chemical properties and separation of phosphoamino acids by thin-layer chromatography and/or electrophoresis. *Methods Enzymol*, 1991, 201: 10-21.
- [44] Kaufmann, H.; Bailey, J. E.; Fussenegger, M.: Use of antibodies for detection of phosphorylated proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, 2001, 1: 194-199.

- [45] Iuga, A.; Brunner, E.: Phosphorylated amino acids: model compounds for solid-state  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopic studies of proteins. *Magn Reson Chem*, 2004, 42: 369-372.
- [46] Niedbalski, J. S.; Ringer, D. P.: Separation and quantitative analysis of O-linked phosphoamino acids by isocratic high-performance liquid chromatography of the 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives. *Anal Biochem*, 1986, 158: 138-145.
- [47] Meyer, H. E.; Eisermann, B.; Heber, M.; Hoffmann-Posorske, E.; Korte, H.; Weigt, C.; Wegner, A.; Hutton, T.; Donella-Deana, A.; Perich, J. W.: Strategies for nonradioactive methods in the localization of phosphorylated amino acids in proteins. *Faseb J*, 1993, 7: 776-782.
- [48] van der Geer, P.; Hunter, T.: Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by electrophoresis and chromatography on thin-layer cellulose plates. *Electrophoresis*, 1994, 15: 544-554.
- [49] Quadroni, M.; James, P.: Phosphopeptide analysis. *Exs*, 2000, 88: 199-213.
- [50] Fadden, P.; Haystead, T. A.: Quantitative and selective fluorophore labeling of phosphoserine on peptides and proteins: characterization at the attomole level by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence. *Anal Biochem*, 1995, 225: 81-88.
- [51] Mann, M.; Jensen, O. N.: Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 255-261.
- [52] McLachlin, D. T.; Chait, B. T.: Analysis of phosphorylated proteins and peptides by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol*, 2001, 5: 591-602.
- [53] Sickmann, A.; Meyer, H. E.: Phosphoamino acid analysis. *Proteomics*, 2001, 1: 200-206.

- [54] Bornstein, P.; Traub, W.: The Proteins, ed. H. Neurath, R. L. Hill. *New York: Academic. 3rd ed.*, 1979, 4: 411-632.
- [55] Eckhart, W.; Hutchinson, M. A.; Hunter, T.: An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates. *Cell*, 1979, 18: 925-933.
- [56] Paquet, A.: Introduction of 9-fluorenylmethyloxycarbonyl, trichloroethoxycarbonyl, and benzyloxycarbonyl amine protecting groups into O-unprotected hydroxyamino acids using succinimidyl carbonates. *Can J Chem*, 1982, 60: 976-980.
- [57] Merrifield, R. B.: Solid-Phase Peptide Synthesis. 3. An Improved Synthesis of Bradykinin. *Biochemistry*, 1964, 3: 1385-1390.
- [58] Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [59] Shapiro, A. L.; Vinuela, E.; Maizel, J. V.: Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*, 1967, 28: 815-820.
- [60] Weber, K.; Osborn, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*, 1969, 244: 4406-4412.
- [61] Lambin, P.; Rochu, D.; Fine, J.M.: A new method for determination of molecular weights of proteins by electrophoresis across a sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gradient gel. *Anal Biochem*, 1976, 74: 567-575.
- [62] Lambin, P.: Reliability of molecular weight determination of proteins by polyacrylamide gradient gel electrophoresis in the presence of sodium dodecylsulfate. *Anal Biochem*, 1978, 85: 114-125.

- [63] Kang, D.; Gho, Y. S.; Suh, M.; Kang, C.: Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull Korean Chem Soc*, 2002, 23: 1511-1512.
- [64] Kyhse-Andersen, J.: Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, 1984, 10: 203-209.
- [65] Karas, M.; Hillenkamp, F.: Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*, 1988, 60: 2299-2301.
- [66] Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M.: Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 1989, 246: 64-71.
- [67] Wilm, M.; Mann, M.: Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem*, 1996, 68: 1-8.
- [68] Jonsson, A. P.: Mass spectrometry for protein and peptide characterisation. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58: 868-884.
- [69] Roepstorff, P.; Fohlman, J.: Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom*, 1984, 11: 601.
- [70] Johnson, R. S.; Martin, S. A.; Biemann, K.: Collision-Induced fragmentation of (M+H)<sup>+</sup> Ions of Peptides. *Int J Mass Spect*, 1988, 86: 137-154.
- [71] Wolfender, J. L.; Chu, F.; Ball, H.; Wolfender, F.; Fainzilber, M.; Baldwin, M. A.; Burlingame, A. L.: Identification of tyrosine sulfation in *Conus pennaceus* conotoxins alpha-PnIA and alpha-PnIB: further investigation of labile sulfo- and phosphopeptides by electrospray, matrix-

- assisted laser desorption/ionization (MALDI) and atmospheric pressure MALDI mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 1999, 34: 447-454.
- [72] Yagami, T.; Kitagawa, K.; Aida, C.; Fujiwara, H.; Futaki, S.: Stabilization of a tyrosine O-sulfate residue by a cationic functional group: formation of a conjugate acid-base pair. *J Pept Res*, 2000, 56: 239-249.
- [73] Kehoe, J. W.; Bertozzi, C. R.: Tyrosine sulfation: a modulator of extracellular protein-protein interactions. *Chem Biol*, 2000, 7: R57-61.
- [74] Murray, K.; Milstein, C.: Esters of serine and threonine in hydrolysates of histones and protamines, and attendant errors in amino acid analyses of proteins. *Biochem J*, 1967, 105: 491-495.
- [75] Murray, K.: The formation of O-sulphates of serine and threonine in protein hydrolysates. *Biochem J*, 1968, 110: 155-156.
- [76] Kalume, D. E.; Molina, H.; Pandey, A.: Tackling the phosphoproteome: tools and strategies. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7: 64-69.
- [77] Kivirikko, K. I.; Myllyla, R.: Posttranslational enzymes in the biosynthesis of collagen: intracellular enzymes. *Methods Enzymol*, 1982, 82 Pt A: 245-304.
- [78] Wijffels, G. L.; Panaccio, M.; Salvatore, L.; Wilson, L.; Walker, I. D.; Spithill, T. W.: The secreted cathepsin L-like proteinases of the trematode, *Fasciola hepatica*, contain 3-hydroxyproline residues. *Biochem J*, 1994, 299 ( Pt 3): 781-790.
- [79] Plowman, G. D.; Sudarsanam, S.; Bingham, J.; Whyte, D.; Hunter, T.: The protein kinases of *Caenorhabditis elegans*: a model for signal transduction in multicellular organisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 13603-13610.
- [80] Hunter, T.: Signaling - 2000 and beyond. *Cell*, 2000, 100: 113-127.

- [81] Kokel, M.; Borland, C. Z.; DeLong, L.; Horvitz, H. R.; Stern, M. J.: *clr-1* encodes a receptor tyrosine phosphatase that negatively regulates an FGF receptor signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev*, 1998, 12: 1425-1437.
- [82] Kemp, B. E.; Pearson, R. B.: Spatial requirements for location of basic residues in peptide substrates for smooth muscle myosin light chain kinase. *J Biol Chem*, 1985, 260: 3355-3359.
- [83] Saiardi, A.; Bhandari, R.; Resnick, A. C.; Snowman, A. M.; Snyder, S. H.: Phosphorylation of proteins by inositol pyrophosphates. *Science*, 2004, 306: 2101-2105.
- [84] Stephens, L.; Radenberg, T.; Thiel, U.; Vogel, G.; Khoo, K. H.; Dell, A.; Jackson, T. R.; Hawkins, P. T.; Mayr, G. W.: The detection, purification, structural characterization, and metabolism of diphosphoinositol pentakisphosphate(s) and bisdiphosphoinositol tetrakisphosphate(s). *J Biol Chem*, 1993, 268: 4009-4015.
- [85] Saiardi, A.; Sciambi, C.; McCaffery, J. M.; Wendland, B.; Snyder, S. H.: Inositol pyrophosphates regulate endocytic trafficking. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 14206-14211.
- [86] Luo, H. R.; Huang, Y. E.; Chen, J. C.; Saiardi, A.; Iijima, M.; Ye, K.; Huang, Y.; Nagata, E.; Devreotes, P.; Snyder, S. H.: Inositol pyrophosphates mediate chemotaxis in *Dictyostelium* via pleckstrin homology domain-PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> interactions. *Cell*, 2003, 114: 559-572.
- [87] Morrison, B. H.; Bauer, J. A.; Kalvakolanu, D. V.; Lindner, D. J.: Inositol hexakisphosphate kinase 2 mediates growth suppressive and apoptotic effects of interferon-beta in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem*, 2001, 276: 24965-24970.

- [88] Saiardi, A.; Erdjument-Bromage, H.; Snowman, A. M.; Tempst, P.; Snyder, S. H.: Synthesis of diphosphoinositol pentakisphosphate by a newly identified family of higher inositol polyphosphate kinases. *Curr Biol*, 1999, 9: 1323-1326.
- [89] Saiardi, A.; Nagata, E.; Luo, H. R.; Snowman, A. M.; Snyder, S. H.: Identification and characterization of a novel inositol hexakisphosphate kinase. *J Biol Chem*, 2001, 276: 39179-39185.
- [90] Laussmann, T.; Eujen, R.; Weissshuhn, C. M.; Thiel, U.; Vogel, G.: Structures of diphospho-myo-inositol pentakisphosphate and bisdiphospho-myo-inositol tetrakisphosphate from Dictyostelium resolved by NMR analysis. *Biochem J*, 1996, 315 ( Pt 3): 715-720.
- [91] Hulmes, D. J.; Miller, A.; Parry, D. A.; Piez, K. A.; Woodhead-Galloway, J.: Analysis of the primary structure of collagen for the origins of molecular packing. *J Mol Biol*, 1973, 79: 137-148.
- [92] Sawada, H.; Konomi, H.; Hirosawa, K.: Characterization of the collagen in the hexagonal lattice of Descemet's membrane: its relation to type VIII collagen. *J Cell Biol*, 1990, 110: 219-227.
- [93] van der Rest, M.; Garrone, R.: Collagen family of proteins. *Faseb J*, 1991, 5: 2814-2823.
- [94] Brady, J. P.; Garland, D.; Duglas-Tabor, Y.; Robison, W. G., Jr.; Groome, A.; Wawrousek, E. F.: Targeted disruption of the mouse alpha A-crystallin gene induces cataract and cytoplasmic inclusion bodies containing the small heat shock protein alpha B-crystallin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 884-889.
- [95] MacRae, T. H.: Structure and function of small heat shock/alpha-crystallin proteins: established concepts and emerging ideas. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57: 899-913.

- [96] Augusteyn, R. C.; Murnane, L.; Nicola, A.; Stevens, A.: Chaperone activity in the lens. *Clin Exp Optom*, 2002, 85: 83-90.
- [97] Aquilina, J. A.; Benesch, J. L.; Ding, L. L.; Yaron, O.; Horwitz, J.; Robinson, C. V.: Phosphorylation of alphaB-crystallin alters chaperone function through loss of dimeric substructure. *J Biol Chem*, 2004, 279: 28675-28680.
- [98] Horwitz, J.: Alpha-crystallin. *Exp Eye Res*, 2003, 76: 145-153.
- [99] de Jong, W. W.; Leunissen, J. A.; Voorter, C. E.: Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family. *Mol Biol Evol*, 1993, 10: 103-126.
- [100] Ito, H.; Kamei, K.; Iwamoto, I.; Inaguma, Y.; Nohara, D.; Kato, K.: Phosphorylation-induced change of the oligomerization state of alpha B-crystallin. *J Biol Chem*, 2001, 276: 5346-5352.
- [101] Quinlan, R. A.; Sandilands, A.; Procter, J. E.; Prescott, A. R.; Hutcheson, A. M.; Dahm, R.; Gribbon, C.; Wallace, P.; Carter, J. M.: The eye lens cytoskeleton. *Eye*, 1999, 13 ( Pt 3b): 409-416.
- [102] Vicart, P.; Caron, A.; Guicheney, P.; Li, Z.; Prevost, M. C.; Faure, A.; Chateau, D.; Chapon, F.; Tome, F.; Dupret, J. M.; Paulin, D.; Fardeau, M.: A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet*, 1998, 20: 92-95.
- [103] Haid, M.: Massenspektrometrische Charakterisierung von Hydroxyprolin/Phosphohydroxyprolin und Identifizierung von Phosphohydroxyprolin in Kristallinen. Dipl.-Arb. *Heinrich-Heine-Univ. Düsseldorf*, 2006: 46-52.