

Afslutningsrapport

Valleproteiner

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 1996-13

December 1996



mejeriforeningen

danish dairy board

Aarhus Universitet
Det Naturvidenskabelige Fakultet
Laboratorium for Proteinkemi

Valleproteiner

AFSLUTNINGSRAPPORT
FØTEK 1

Torben Ellebæk Petersen,
lektor, lic.scient., projektleder

A. Titel på projekt.

Valleproteiner

2.1 Leder af projekt/kontaktperson.

Lektor Torben Ellebæk Petersen, lic.scient.
Laboratorium for Proteinkemi, Aarhus Universitet.
Tel. 86202000, Fax. 86136597

2.2 Projektets personale

Foruden undertegnede, har følgende personer arbejdet på FØTEK 1 projektet
Valleproteiner :

Forskningsadjunkt, cand. scient. Esben Skipper Sørensen, Ph.D.
Laborant Lise Møller

Følgende har teknisk og administrativt været tilknyttet projektet:

Ingeniør Roy Erwin Guldborg.
Fuldmægtig Gert Johansen Almind.

2.3 Eksterne kontakter/samarbejdspartnere.

Professor Pekka Mäenpää, Department of Biochemistry and Biotechnology,
University of Kuopio, Finland.
Professor David T. Denhardt, Department of Biological Sciences, Nelson
Biological Laboratories, Rutgers University, New Jersey, USA.
Professor Matthew Williamson, Department of Biology, University of California
San Diego, La Jolla, California, USA.
Dr. Vince Farnsworth, Beckman Instruments Inc., Fullerton, California, USA.
Dr. Man-Sun Sy, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA.
Dr. Elizabeth Rowatt, Department of Medical Microbiology, University College
London Medical School, London, England.
Professor R.J.P Williams, Inorganic Chemistry Laboratory, University of Oxford,
Oxford, England.
Dr. Adele L. Boskey, Director of Research, The Hospital for Special Surgery, New
York.
Dr. Michael Horton, Imperial Cancer Research Fund, St. Bartholomew's Hospital,
London.

3.1 Formål med projektet.

At isolere og karakterisere proteiner fra vallefraktionen af bovin mælk

3.2 Projektets baggrund, udførelse og resultater

For baggrund, specifikke resultater og diskussion af disse henvises til de refererede publikationer (se vedlagte publikationsliste).

Introduktion

Valleproteinerne er traditionelt defineret som de proteiner der forbliver i opløsning efter udfældning af kaseinerne. Denne udfældning kan foretages ved justering af pH til 4,6 eller ved koagulering som følge af tilsætning af osteløbe. I bovin mælk udgør valleproteinerne 20% af den totale proteinmængde. Hovedkomponenterne i vallefraktionen er β -laktoglobulin, α -laktalbumin, serum albumin og immunoglobuliner som tilsammen udgør 17% af mælkeproteinet. Udover disse proteiner, der alle er relativt velkarakteriserede med hensyn til struktur og funktion, indeholder vollen en mængde hidtil ubeskrevne proteiner og peptider. En del af disse findes i den varme og syrestabile fraktion af mælk, den såkaldte proteose-pepton fraktion. Denne fraktion er en kompleks blanding af glykoproteiner, fosfoproteiner og peptider hvor hovedkomponenterne udgøres af PP3, PP5 og PP8. Komponenterne PP5 og PP8 repræsenterer de kraftigt fosforylerede fragmenter, 1-105(107) og 1-28, af β -kasein. Disse fragmenter er formodentlig et resultat af plasmin aktiviteten i mælken. Udover peptider fra kaseinerne, indeholder proteose-pepton fraktionen en mængde dårligt eller helt ubeskrevne proteiner. PP3 er hovedkomponenten i fraktionen og udgør omkring 25% af den totale proteinmængde. Hidtil har strukturen, funktionen og oprindelsen af PP3 været ukendt. Osteopontin, et kraftigt fosforyleret glykoprotein oprindeligt oprenset fra knoglevæv, har også vist sig at være tilstede i proteose-pepton fraktionen af mælk. Oprensningen af osteopontin fra mælk har gjort det muligt at foretage strukturelle studier af dette protein. Under FØTEK 1 har vi oprenset proteose-pepton komponent 3 (PP3) og osteopontin, to for mælk hidtil ukarakteriserede valleproteiner og er påbegyndt karakteriseringen af disse. Begge disse proteiner har ret specielle fysiske egenskaber idet de begge indeholder kulhydratgrupper, store mængder sure aminosyrer, er kraftigt fosforylerede og calcium bindende.

3.2.1 PP3

PP3 er hovedkomponenten i proteose-pepton fraktionen og koncentrationen i komælk er min. 200 mg/l. Under dette projekt har vi udviklet en oprensningsprocedure og oprenset relativt store mængder PP3 [1]. Følgende har vi bestemt aminosyresekvensen af proteinet, samt lokaliseret 5 fosforyleringer og 3 glykosyleringer i proteinet [2,3]. For at undersøge lokaliseringen af PP3 i mælken har vi med specifikke antistoffer mod PP3 underkastet forskellige mælkefraktioner Western blotting analyse. Resultatet af denne analyse viste at PP3 findes i sur valle og i fedtkuglemembranen, derimod var der ikke spor af PP3 i kaseinmicellerne.

For at afgøre om PP3 var et nativt protein og ikke blot et fragment har vi klonet proteinet. Den efterfølgende cDNA sekventering viste at PP3 er et fuldstændigt protein. Analyse af cDNA sekvensen viste at PP3 er homolog med immunoproteinet GlyCAM-1 [4], et protein der oprindeligt er opdaget i mus og rotte hvor det spiller en vigtig rolle i recirkulationen af

lymfocytter. Analyse af sekvensen for PP3 sandsynliggør, at proteinet har en C-terminal amfipatisk α -helix. En sådan helix kan fungere som anker i lipidmembraner og kan måske forklare tilstedeværelsen af PP3 i fedtkuglemembranen.

3.2.2 Osteopontin

Osteopontin er oprindeligt oprenset fra knoglevæv og har indtil for nyligt været betragtet som et knoglespecifikt protein. Vi har nu vist at proteinet er tilstede i betragtelige mængder i bovin mælk (min. 20 mg/l) [1]. Inden for de sidste par år er det blevet påvist, at osteopontin spiller en vigtig rolle i næsten alle fysiologiske processer, hvor kalcificering finder sted. Dette omfatter både godartede kalcificeringer som knogledannelse og vækst og ondartede kalcificeringer som nyrestendannelse og arteriosklerose. Det er teorien at osteopontin vha. sine sure aminosyrer og fosforyleringer er i stand til at indtage flere konformationer og derved kontrollere, moderere eller hæmme krystaldannelse i tilstedeværelse af kalcium salte.

Den relativ store koncentration af osteopontin gør mælk til et vigtig udgangsmateriale for oprensning af proteinet med henblik på strukturelle og biologiske studier. Vi har således leveret bovin mælke osteopontin til flere forskergrupper, der studerer biologiske og medicinske processer der involverer osteopontin.

Western blotting analyser med antistoffer mod osteopontin har vist at proteinet findes i både valle- og kasein-fraktionen. Vi har vist, at osteopontin i mælk fosforyleres på seriner/threoniner placeret i motiver genkendt af mammary gland kasein kinase og kasein kinase II [5]. Ved kombination af massespektrometri og sekvensanalyse [6] har vi lokaliseret 28 fosforyleringer og 3 kulhydratgrupper i proteinet [7-10]. Endvidere har vi vist at osteopontin er substrat for transglutaminase og lokaliseret de glutamin rester der kan indgå i transglutaminase-katalyseret krydsbindinger [11].

3.2.3 Metodeudvikling

I arbejdet med lokalisering af posttranslationelle modifikationer i osteopontin har vi sat metoder op til identifikation af fosforylede aminosyrer ved hjælp af massespektrometri og aminosyre analyse.

Vi har observeret specielle fragmenteringsmønstre for fosfopeptider ved MALDI massespektrometri. Peptider indeholdende fosfoserin giver karakteristiske spektre med massedifferencer på 98 Da/fosfoserin mellem ionerne. Ved at optage et MALDI spektrum af et peptid er det altså muligt, med den rette laser intensitet, at bestemme om peptidet er fosforyleret og også mængden af fosfoseriner.

Ved optimering af OPA-derivatisering, kromatografi og detektion, har vi forbedret eksisterende aminosyre analyse system til detektion af fosfoserin og fosfothreonin, således at det nu er muligt at detektere i området under 10 pmol.

3.3 Tidsplan

Faser / aktiviteter

- A: Kortlægning og karakterisering af proteiner i proteose-pepton fraktionen af valle.
- B: Strukturstudier af PP3.
- C: Strukturstudier af osteopontin.
- D: Udvikling og optimering af metoder til identifikation af posttranslationelle modifikationer.

Varighed

	1992	:	1993	:	1994	:	1995	:	1996
A:	xx	xxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxx	xxxxxxxx		
B:	xx	xxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxx	xxxxxxxx		
C:	xx	xxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxx	xxxxxxxxxxxx	xxxxxxxx		
D:						xxxxxxxxxxxx			

Start: 1/11-1992

Slut: 30/6-1996

4. Konklusion

Formålet med dette FØTEK 1 projekt var at isolere og karakterisere proteiner fra vallefraktionen. Med isoleringen og karakteriseringen af PP3 og osteopontin, to proteiner der først er blevet fuldt identificeret og karakteriseret under dette FØTEK projekt, må dette mål siges at være nået. Projektets resultater er udgivet i form af 11 publikationer i internationale peer reviewed tidsskrifter. Resultaterne har ligeledes været præsenteret på nationale og internationale konferencer. Derudover har projektet resulteret i en cand. scient. afhandling og en Ph.D. afhandling. Endelig er de opnåede resultater summeret i en oversigtsartikel i *Mælkeritidende*.

Publikationer - FØTEK 1: "Valleproteiner"

- [1] Esben S. Sørensen and Torben E. Petersen (1993) Purification and characterization of three proteins isolated from the proteose peptone fraction of bovine milk. *Journal of Dairy Research* **60**:189-197.
- [2] Esben S. Sørensen and Torben E. Petersen (1993) Phosphorylation, glycosylation and amino acid sequence of component PP3 from the proteose peptone fraction of bovine milk. *Journal of Dairy Research* **60**:535-542.
- [3] Esben S. Sørensen and Torben E. Petersen (1993) Phosphoproteins. *Protein Science* **2** (Suppl.1):111.
- [4] Laust B. Johnsen, Esben S. Sørensen, Torben E. Petersen and Lars Berglund (1995) Characterization of a bovine mammary gland PP3 cDNA reveals homology with mouse and rat adhesion molecule GLYCAM-1. *Biochemical Biophysical Acta* **1260**:116-118.
- [5] Esben S. Sørensen and Torben E. Petersen (1994) Identification of two phosphorylation motifs in bovine osteopontin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **198**:200-205.
- [6] Esben S. Sørensen, Lone K. Rasmussen, Peter Højrup and Torben E. Petersen (1995) Localization of *in vivo* phosphorylation sites in multiphosphorylated proteins: Application of S-ethylcysteine derivatization and mass spectrometric analysis. In: *Methods in Protein Structure Analysis*, Eds, M. Z. Atassi and E. Appella. Plenum Press, NY., pp. 217-225.
- [7] Esben S. Sørensen, Lone K. Rasmussen, Lise Møller, Poul H. Jensen, Peter Højrup and Torben E. Petersen (1994) Identification of posttranslational modifications in bovine osteopontin: localization of 28 phosphorylation sites, 3 O-glycosylation sites and 2 transglutaminase reactive glutamines. *Journal of Protein Chemistry* **13**:539.
- [8] Esben S. Sørensen and Torben E. Petersen (1995) Localization of posttranslational modifications in bovine osteopontin. *Calcified Tissue International* **56**:465.
- [9] Esben S. Sørensen and Torben E. Petersen (1995) Phosphorylation, glycosylation, and transglutaminase sites in bovine osteopontin. *Annals of The New York Academy of Sciences* **760**:363-366.
- [10] Esben S. Sørensen, Peter Højrup and Torben E. Petersen (1995) Posttranslational modifications of bovine osteopontin: Identification of twenty-eight phosphorylation- and three O-glycosylation sites. *Protein Science* **4**:2040-2049.

- [11] Esben S. Sørensen, Lone K. Rasmussen, Lise Møller, Poul H. Jensen, Peter Højrup and Torben E. Petersen (1994) Localization of transglutaminase-reactive glutamine residues in bovine osteopontin. *Biochemical Journal* **304**:13-16.
- [12] Esben S. Sørensen (1995) Osteopontin and component PP3. Characterization of two multiphosphorylated proteins from milk. Ph.D. thesis, University of Aarhus.
- [13] Esben S. Sørensen (1993) Characterization of proteins from the proteose-peptone fraction of bovine milk. cand. scient. thesis, University of Aarhus.
- [14] Esben S. Sørensen and Torben E. Petersen (1996) Proteose-pepton fraktionen fra mælk indeholder hidtil ubeskrevne proteiner. *Mælkeritidende* **21**:531-533.

