

Chemisches Cross-Linking und Massenspektrometrie zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung von Proteinen

Daniela M. Schulz und Andrea Sinz

Nachwuchsgruppe „Protein-Ligand-Wechselwirkung mittels Ionen-Cyclotron-Resonanz-Massenspektrometrie“, Biotechnologisch-Biomedizinisches Zentrum, Fakultät für Chemie und Mineralogie, Universität Leipzig

► Um die Funktionsweisen von Proteinen verstehen zu können, ist es wichtig, die zugrundeliegenden strukturellen Zusammenhänge zu kennen. Bisher war die Aufklärung der räumlichen Struktur von Proteinen und Proteinkomplexen den etablierten, hoch-

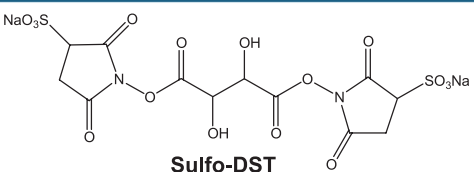
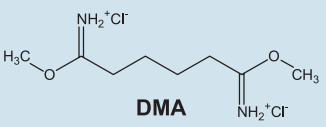
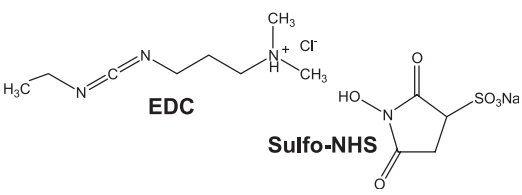
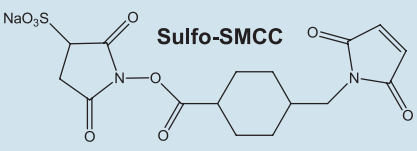
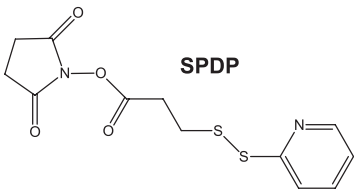
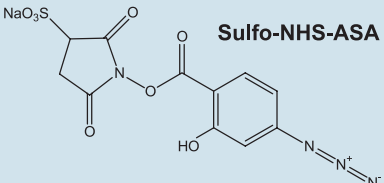
auflösenden Methoden wie der Röntgenstrukturanalyse und der NMR (Kernmagnetresonanz)-Spektroskopie vorbehalten. Beide Methoden haben jedoch Limitierungen: Für die Röntgenstrukturanalyse braucht man geeignete Kristalle; in der NMR-Spekt-

roskopie werden große Analytmengen benötigt und es besteht eine Limitierung in der Größe der zu untersuchenden Proteine (etwa 50 kD).

In den letzten Jahren wurden auf dem Gebiet der Massenspektrometrie erhebliche Fortschritte bezüglich Auflösung, Sensitivität und Massengenauigkeit erzielt, die den hohen Anforderungen der Proteinstrukturanalytik gerecht werden^[1, 2]. Diese Fortschritte in der Massenspektrometrie ermöglichen, in Verbindung mit chemischem Cross-Linking¹, einer traditionellen Methode der Proteinchemie, die Entwicklung eines alternativen experimentellen Ansatzes für die Untersuchung dreidimensionaler Proteinstrukturen. Unter chemischem Cross-

¹ Es wird der englische Ausdruck „Cross-Linking“, anstatt „Quervernetzung“ verwendet, da sich dieser in der Literatur durchgesetzt hat.

Tab. 1: Cross-Linking-Reagenzien

Cross-Linking-Reagenz	„Spacer“-Länge	Name und Beschreibung
<p>(1)</p>  <p>Sulfo-DST</p>	6,4 Å	Di(sulfosuccinimidyl)tartrat homobifunktionell; reaktive Gruppen: Sulfo-NHS-Ester (aminreaktiv); spaltbar durch Natriumperiodat
<p>(2)</p>  <p>DMA</p>	8,6 Å	Dimethyladipimidat homobifunktionell; reaktive Gruppen: Imidoester (aminreaktiv)
<p>(3)</p>  <p>EDC Sulfo-NHS</p>	„zero-length“	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid/N-Hydroxysulfosuccinimid Carbodiimid, Bildung einer Amidbindung zwischen Amino- und Carboxylgruppe, Sulfo-NHS bildet stabiles Intermediat
<p>(4)</p>  <p>Sulfo-SMCC</p>	11,6 Å	Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat heterobifunktionell; reaktive Gruppe 1: Sulfo-NHS-Ester (aminreaktiv), reaktive Gruppe 2: Maleimid (sulfhydrylspezifisch)
<p>(5)</p>  <p>SPDP</p>	6,8 Å	N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat heterobifunktionell; reaktive Gruppe 1: NHS-Ester (aminreaktiv), reaktive Gruppe 2: Pyridyldisulfid (sulfhydrylspezifisch), vermittelt Thiol-Disulfidaustausch-Reaktion
<p>(6)</p>  <p>Sulfo-NHS-ASA</p>	8,0 Å	N-Hydroxysulfosuccinimidyl-4-azidosalicylsäure heterobifunktionell; reaktive Gruppe 1: Sulfo-NHS-Ester (aminreaktiv), reaktive Gruppe 2: Arylazid (photoreaktiv)

Für weitere Reagenzien und detaillierte Informationen zu den Reaktionsmechanismen sei auf die Fachliteratur verwiesen^[3, 4, 7].

Linking von Proteinen versteht man das Einführen einer kovalenten Bindung zwischen funktionellen Gruppen von Aminosäuren innerhalb eines Proteins (intramolekular), oder zwischen interagierenden Proteinen (intermolekular) mittels eines chemischen Reagenzes^[3, 4]. Voraussetzung hierfür ist, dass sich geeignete funktionelle Gruppen von Aminosäureresten entsprechend nahe kommen. Chemisches Cross-Linking von Proteinen mit nachfolgender enzymatischer Spaltung des Reaktionsgemisches und anschließender Identifizierung der Reaktionsprodukte mittels Massenspektrometrie hat sich inzwischen als effiziente Methode zur Aufklärung von Proteinstrukturen etabliert^[5, 6]. Die Experimente sind vergleichsweise schnell durchzuführen, es werden nur geringe Proteinmengen benötigt und die Größe der zu untersuchenden Proteine ist theoretisch unbegrenzt, da lediglich die enzymatischen Spaltprodukte analysiert werden. Das größte Problem, mit dem man sich bei der Durchführung derartiger Experimente konfrontiert sieht, ist die hohe Komplexität der entstehenden Reaktionsgemische.

Intramolekulares Cross-Linking innerhalb eines Proteins erlaubt es, Rückschlüsse auf die Konformation des Proteins zu ziehen, wohingegen intermolekulares Cross-Linking zwischen Proteinen der Aufklärung interagierender Sequenzen innerhalb eines Proteinkomplexes dient. Man muss sich jedoch der Tatsache bewusst sein, dass die limitierte Anzahl erfassbarer Wechselbeziehungen lediglich die Ableitung niederaufgelöster Strukturen erlaubt.

Cross-Linking-Reagenzien

Für die Durchführung von Cross-Linking-Experimenten steht eine große Anzahl an kommerziell erhältlichen Cross-Linking-Reagenzien mit unterschiedlichen Längen, Spezifitäten und reaktiven Gruppen zur Auswahl^[7] (Tab. 1, auf Seite 46).

Am häufigsten werden Reagenzien eingesetzt, deren reaktive Gruppen mit Aminogruppen, wie dem N-Terminus sowie ϵ -Aminogruppen von Lysinresten in Proteinen reagieren. Zu ihnen zählen die N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester, denen aufgrund ihrer geringen Wasserlöslichkeit ihre wasserlöslichen Sulfo-Analoga vorzuziehen sind (1). Die ebenfalls aminspezifischen Imidoester (2) liefern bei physiologischem pH-Wert protonierte Reaktionsprodukte (Amidine), was sowohl für den Erhalt der dreidimensionalen Struktur des Proteins, als auch für die anschließende massenspektrometrische Detektion der Cross-Linking-Produkte erstrebenswert ist. Eine weitere Gruppe häufig eingesetzter Cross-Linking-Reagen-

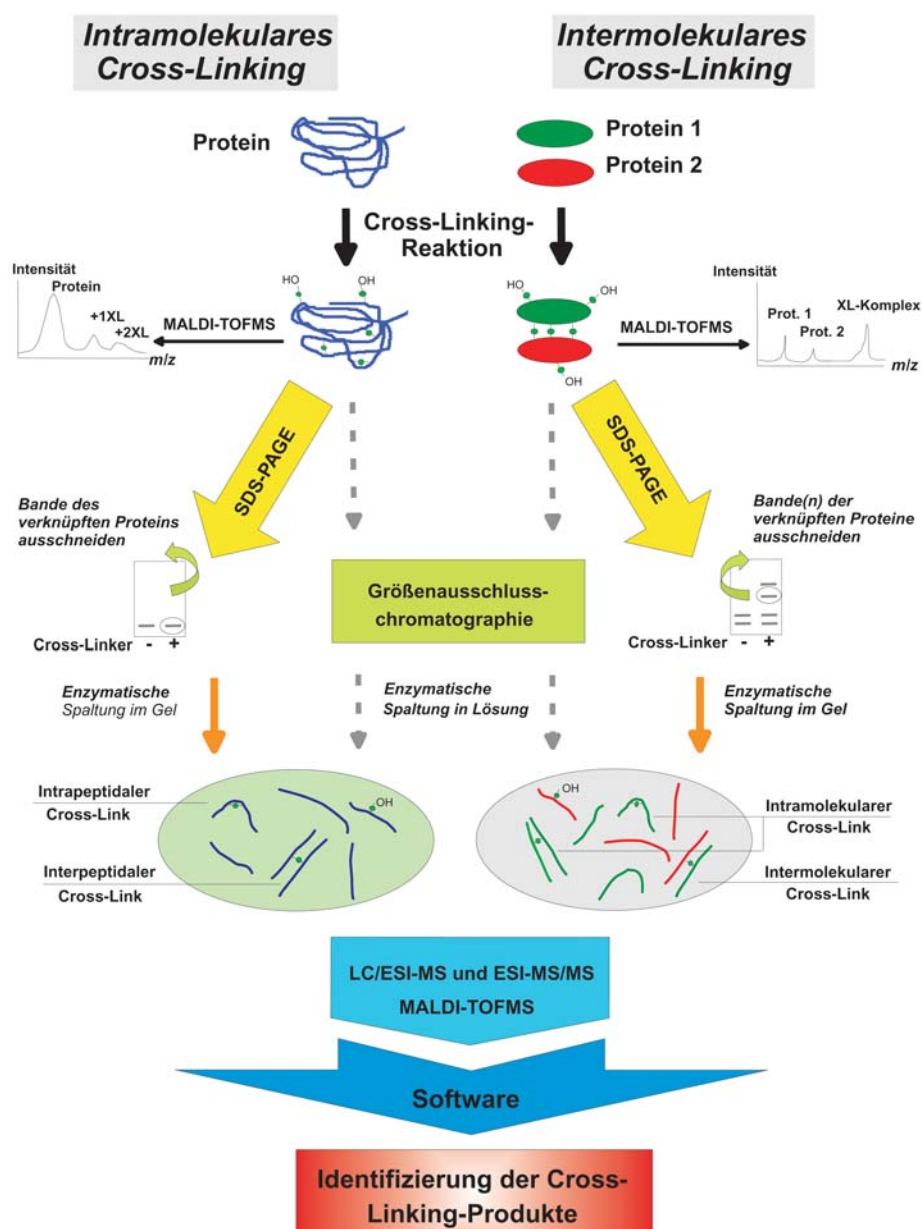


Abb. 1: Analytische Strategien für intra- und intermolekulares Cross-Linking

zien ist die der Carbodiimide (3). Sie vermitteln die Bildung einer Amidbindung zwischen der Carboxylgruppe einer sauren Aminosäure (Asp, Glu) bzw. der freien Carboxylgruppe des C-Terminus und einer Aminogruppe (Lys, N-Terminus). Häufig werden Carbodiimide, wie beispielsweise EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid) in Kombination mit Sulfo-NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid) eingesetzt, welches mit dem Protein ein stabiles Intermediat bildet. Neben den aminreaktiven Cross-Linkern werden auch solche häufig verwendet, welche spezifisch mit Sulfhydrylgruppen von Cysteinresten reagieren. Zu ihnen zählen die Maleimide (4) und Cross-Linker, die Thiol-Disulfidaustausch-Reaktionen initiieren (5). Sie werden häufig in

heterobifunktionellen Cross-Linking-Reagenzien eingesetzt. Eine weitere Gruppe von Cross-Linking-Reagenzien sind die photoreaktiven Cross-Linker, wie z. B. Arylazide (6). Diese reagieren unspezifisch an beispielsweise C-H- und N-H-Bindungen, wenn sie UV-Strahlung ausgesetzt werden^[3, 4].

Zusätzlich zu ihren unterschiedlichen Reaktivitäten werden Cross-Linking-Reagenzien einmal nach der Distanz, die sie zwischen zwei funktionellen Gruppen überbrücken, sowie nach der Anzahl funktioneller Gruppen unterteilt (Tab. 1). Bifunktionelle Cross-Linking Reagenzien tragen zwei funktionelle Gruppen, welche über einen „Spacer“ definierter Länge verbunden sind. Homobifunktionelle Cross-Linker (1, 2)

haben zwei identische reaktive Gruppen, wohingegen heterobifunktionelle Cross-Linking-Reagenzien (4, 5, 6) über zwei unterschiedliche reaktive Gruppen verfügen. Von den vorgenannten Cross-Linker-Typen sind die so genannten „zero-length“ Cross-Linker zu unterscheiden, die keinen zusätzlichen „Spacer“ einführen (3). Zu den meist verwendeten „zero-length“ Cross-Linkern gehören die Carbodiimide^[3, 4].

Intra- und intermolekulares Cross-Linking

Chemisches Cross-Linking in Verbindung mit massenspektrometrischen Methoden ermöglicht sowohl die Bestimmung niederaufgelöster dreidimensionaler Proteinstrukturen, als auch die Aufklärung interagierender Aminosäuresequenzen in Proteinkomplexen (Abb. 1). Für intramolekulares Cross-Linking werden bevorzugt homo- bzw. heterobifunktionelle Cross-Linking-Reagenzien verwendet. Für intermolekulares Cross-Linking hingegen hat sich EDC in Verbindung mit Sulfo-NHS besonders bewährt, da es als „zero-length“-Cross-Linker zwei funktionelle Gruppen von Aminosäuren direkt miteinander verknüpft; es kommen aber auch hier homo- oder heterobifunktionelle Cross-Linking-Reagenzien zum Einsatz. Die Proteinkonzentrationen sollten sich im mikromolaren Bereich bewegen, um unerwünschte Aggregatbildung zu vermeiden. Die Bildung hochmolekularer Aggregate lässt sich leicht mittels eindimensionaler Gelelektrophorese (SDS-PAGE), bzw. MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight)-Massenspektrometrie überprüfen. Zusätzlich erhält man anhand der relativen Farbinintensitäten der im Gel gefärbten, intermolekular verknüpften Proteinkomplexe eine Aussage zum Umsatz der Cross-Linking-Reaktion. Im Hinblick auf den Erhalt der dreidimensionalen Struktur des zu untersuchenden Proteins bzw. des Proteinkomplexes ist es besonderes wichtig, nicht zu viele Cross-Links einzuführen; gleichzeitig ist die vermehrte Bildung eines bestimmten Cross-Links jedoch Voraussetzung für die spätere Detektion im Massenspektrometer. Im Anschluss an die gelelektrophoretische Auftrennung des Reaktionsgemisches wird die Bande des durch Cross-Linking-Reagenzien verknüpften Proteins bzw. Proteinkomplexes ausgeschnitten und im Gel einer enzymatischen Spaltung (meist durch Trypsin) unterzogen. Alternativ hierzu kann das Reaktionsgemisch auch über eine Größenausschlusschromatographie getrennt und die Proteolyse in Lösung vollzogen werden. Im Falle des intramolekularen Cross-Linkings eines Proteins erhält man ein Peptidgemisch, welches unmodifizierte Peptide des Proteins enthält, wie auch Peptide, die einen partiell hydrolysierten Cross-Linker enthalten; hinzu kommen intramolekulare Cross-Linking-Produkte, bei denen man wiederum zwischen intra- und interpeptidalen Cross-Links unterscheidet. Das Peptidgemisch des intermolekularen Cross-Linkings setzt sich neben unmodifizierten Peptiden der beiden eingesetzten Proteine und mit partiell hydrolysiertem Cross-Linker modifizierten Peptiden, aus Reaktionsprodukten durch inter- und intramolekulares Cross-Linking zusammen. Die erhaltene komplexe Peptidmischung wird mittels LC/ESI (Liquid Chromatography/Electrospray Ionization)-MS bzw. ESI-MS/MS (ESI-Tandem-Massenspektrometrie) oder MALDI-TOFMS analysiert und den detektierten Massen werden mit Hilfe von Computersoftware Cross-Linking-Produkte zugeordnet. Intramolekulare Cross-Links geben Auskunft über die räumliche Struktur des Proteins. Peptide mit hydrolysiertem Cross-Linker geben Hinweise auf die Oberflächenzugänglichkeit bestimmter funktioneller Gruppen. Anhand intermolekularer Cross-Links ist ▶▶

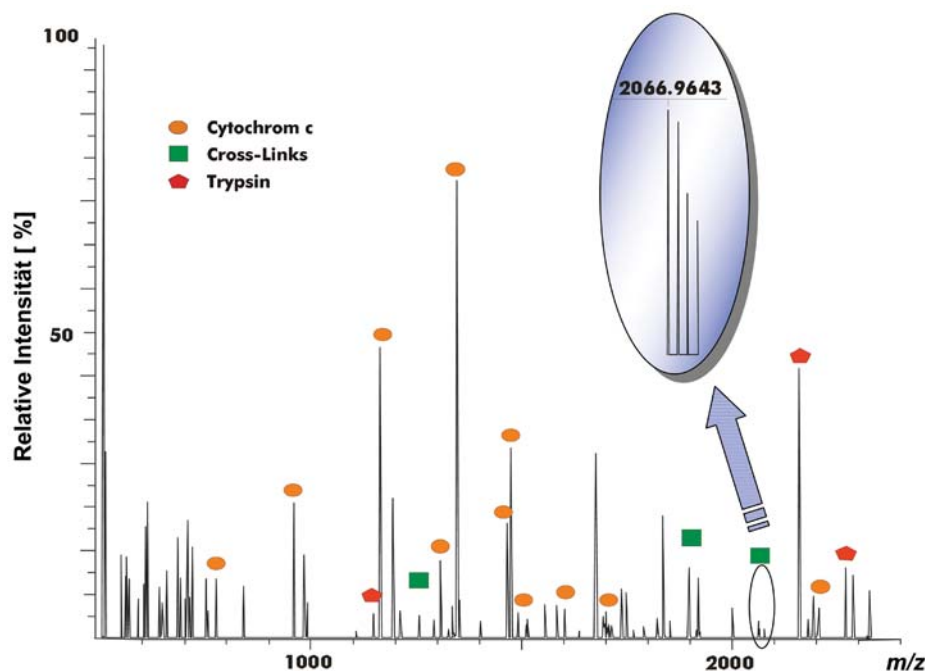


Abb. 2: ESI-FTICR-Massenspektrum nach tryptischer Spaltung eines Cross-Linking-Reaktionsgemisches von Cytochrom c^[6].

► die Bestimmung interagierender Sequenzen von Proteinen eines Proteinkomplexes möglich, wohingegen intramolekulare Cross-Linking-Produkte Hinweise auf Konformationsänderungen der beteiligten Proteine bei Komplexbildung geben können.

Identifizierung der Cross-Linking-Produkte

Trotz der Stärken der Massenspektrometrie erweist sich die Identifizierung der Cross-Linking-Produkte häufig sprichwörtlich als Suche nach der „Nadel im Heuhaufen“. Zahlreiche Strategien wurden entwickelt, um die Analyse der Cross-Linking-Produkte mit Hilfe von Massenspektrometrie in den komplexen Gemischen zu erleichtern. So werden beispielsweise isoto-penmarkierte Cross-Linking-Reagenzien verwendet oder die Proteine selbst sind isoto-penmarkiert. Zum Einsatz kommen auch Reagenzien, die nach der Cross-Linking-Reaktion fluoreszieren und somit das Auf-finden der Reaktionsprodukte vereinfachen. Auch Cross-Linker, die nach Isolierung der Produkte und anschließender Fragmentierung mittels MS/MS charakteristische Frag-mente liefern, eignen sich zur Identifizierung der Cross-Linking-Produkte. Massen-spektrometrische Methoden, wie die FTICR (Fourier Transformation Ionen-Cyclotron-Resonanz)-Technik, die überragende Massengenauigkeiten und Auflösung liefert, erlauben die Identifizierung von Cross-Linking-Produkten allein anhand der hochgenauen Massen^[8, 9]. Ein Beispiel hier-

für zeigt Abb. 2, in der das Massenspektrum einer tryptischen Spaltpeptidmischung von Cytochrom c, das mit einem homobi-funktionellen, aminreaktiven Cross-Linking-Reagenz modifiziert wurde, zu sehen ist^[8].

Unerlässlich für die schnelle und zwei-felsfreie Auswertung der komplexen massenspektrometrischen Daten ist eine sorgfältig ausgearbeitete Software, die die Massen möglicher Cross-Linking-Pro-dukte berechnet und sie mit den experi-mentell erhaltenen Massen vergleicht. Jedoch ist ein für jedermann zugängliches Programm, welches allen Anforderungen gerecht wird, zum jetzigen Zeitpunkt nicht verfügbar.

Ausblick

Um dem Ziel der generellen Anwendbarkeit der vorgestellten Methode in der Protein-strukturanalytik näher zu kommen, bedarf es der Synthese neuer Cross-Linking-Rea-genzien, einer besseren Kenntnis der Kine-tiken von Cross-Linking-Reaktionen, der Entwicklung neuer Strategien für eine vereinfachte Identifizierung von Cross-Linking-Produkten sowie einer Verbesserung der existierenden Computersoftware zur Da-tenauswertung. Trotz der bestehenden Schwierigkeiten ist chemisches Cross-Linking in Verbindung mit massenspektrometri-schen Methoden eine vielversprechende Methode, die mit hoher Wahrscheinlichkeit künftig zunehmende Bedeutung für die

strukturelle und funktionelle Charakterisie-rung von Proteinen erlangen wird.

Literatur

- [1] Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M. (1989): Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* 246: 64–71
- [2] Mann, M., Talbo, G. (1996): Developments in matrix-assisted laser desorption/ionization peptide mass spectrometry. *Curr. Opin. Biotech.* 7: 11–19
- [3] Hermanson, G. T.: Bioconjugate Techniques. Academic Press Inc., San Diego CA, USA, 1996
- [4] Wong, S. S.: Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking. CRC Press Inc., Boca Raton FL, USA, 1991
- [5] Sinz, A. (2003): Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry for Mapping Three-Dimensional Structures of Proteins and Protein Complexes. *J. Mass Spectrometry* 38: 1225–1237
- [6] Back, J. W., de Jong, L., Muijsers, A. O., de Koster, C. G. (2003): Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry for Protein Structural Modeling. *J. Mol. Biol.* 331: 303–313.
- [7] Pierce Biotechnology Inc.: Applications Hand-book and Catalogue 2003/2004. Rockford IL, USA, 2003
- [8] Dihazi, G. H., Sinz, A. (2003): Mapping low-resolution three-dimensional protein structures using chemical cross-linking and Fourier transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spec-trom.* 17: 2005–2014
- [9] Kruppa, G. H., Schoeniger, J., Young, M. M. (2003): A top down approach to protein structural studies using chemical cross-linking and Fourier transform mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spec-trom.* 17: 155–162

Korrespondenzadresse:

Dr. Andrea Sinz
Nachwuchsgruppe „Protein-Ligand-Wechselwirkung mittels Ionen-Cyclotron-Resonanz-Massenspektrometrie“
Biotechnologisch-Biomedizinisches Zentrum
Fakultät für Chemie und Mineralogie
Universität Leipzig
Linnéstr. 3
04103 Leipzig
Tel.: 0341-9736078
Fax: 0341-9736115
sinz@chemie.uni-leipzig.de