

Leitersequenzierung von Peptiden und Proteinen – eine Kombination von Edman-Abbau und Massenspektrometrie

Jörg W. Metzger*

Die wichtigste Methode zur Bestimmung der Primärstruktur von Proteinen ist der 1950 von Edman entwickelte stufenweise chemische Abbau (Edman-Abbau)^[1]. Durch die Umsetzung der N-terminalen Aminogruppe des Peptids oder des Proteins mit Phenylisothiocyanat entsteht dabei zunächst das Phenylthiocarbamoylpeptid **1**, das in saurer Lösung in ein 2-Anilinothiazolin-5-on **2** und die um eine Aminosäure verkürzte Peptidkette **3** gespalten wird (Abb. 1). Das instabile Thiazolinon **2** hydrolysiert zur Phenylthiocarbamoylaminosäure (PTC-Aminosäure) **4**, die unter Ringschluß in das 3-Phenyl-2-thiohydantoin (PTH-Aminosäure) **5** übergeht. Die PTH-Aminosäure **5** wird extrahiert und chromatographisch identifiziert. Ein wesentlicher Nachteil dieses vollautomatischen Edman-Abbaus mit on-line-HPLC ist der relativ geringe Probendurchsatz; selbst nach Optimierung der Reaktions- und Analysenzeiten können nur etwa 60 Reste pro Tag bestimmt werden^[2]. Viele ungewöhnliche Aminosäuren können nicht und modifizierte Aminosäuren (z.B. phosphorylierte Aminosäuren) erst nach speziell ausgearbeiteten Prozeduren identifiziert werden^[3].

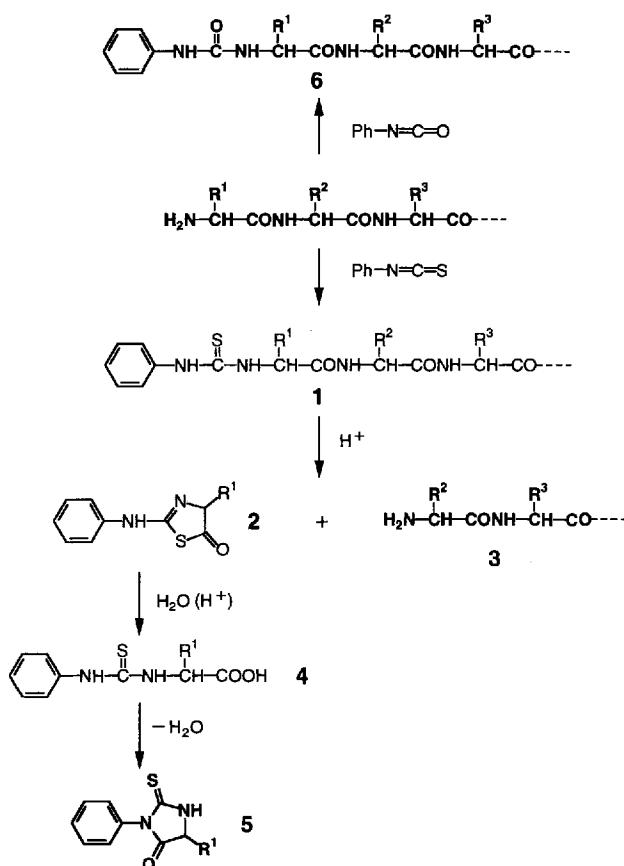


Abb. 1. Erzeugung der Peptidleiter durch Edman-Abbau in Gegenwart von Phenylisothiocyanat als terminierendem Reagens.

[*] Dr. J. W. Metzger

Institut für Organische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 18, D-72076 Tübingen
Telefax: Int. +7071/29-6925

nosäure) **4**, die unter Ringschluß in das 3-Phenyl-2-thiohydantoin (PTH-Aminosäure) **5** übergeht. Die PTH-Aminosäure **5** wird extrahiert und chromatographisch identifiziert. Ein wesentlicher Nachteil dieses vollautomatischen Edman-Abbaus mit on-line-HPLC ist der relativ geringe Probendurchsatz; selbst nach Optimierung der Reaktions- und Analysenzeiten können nur etwa 60 Reste pro Tag bestimmt werden^[2]. Viele ungewöhnliche Aminosäuren können nicht und modifizierte Aminosäuren (z.B. phosphorylierte Aminosäuren) erst nach speziell ausgearbeiteten Prozeduren identifiziert werden^[3].

Aufgrund der hervorragenden Eignung neuer Ionisierungsverfahren wie der Matrix-unterstützten Laserdesorption (MALDI)^[4] und der Elektrospray-Ionisierung (ESI)^[5] für die Peptid- und Proteinanalytik gewinnen massenspektrometrische Sequenzierungsverfahren zunehmend an Bedeutung.

Die Tandem-Massenspektrometrie^[6] ist als wichtiges Verfahren zur Gewinnung von Sequenzinformationen von Peptiden und Proteinen schon seit längerem bekannt^[7]. Für diese Technik sind zwei Massenanalysatoren (MS-MS) erforderlich. Das bei der Ionisierung entstandene Molekülion eines Peptids wird im ersten Massenanalysator selektiert und gelangt dann in eine Kollisionszelle, wo es durch Zusammenstoß mit Argonatomen gezielt fragmentiert wird (collision induced dissociation; CID). Die Fragment-Ionen werden im zweiten Massenanalysator nach ihrem *m/z*-Verhältnis aufgetrennt und als „Produkt-“ oder „Tochterionenspektrum“ registriert. Dieses Spektrum enthält je nach Peptidsequenz Serien von N-terminalen, C-terminalen oder inneren Fragment-Ionen, die durch Bindungsbruch entlang des Peptidrückgrats gebildet wurden. Aus den Massendifferenzen zwischen einzelnen Massenpeaks läßt sich in günstigsten Fällen die gesamte Sequenz ableiten. Je nach Kollisionsenergie unterscheidet man Hochenergie- und Niederenergie-CID-Spektren.

Die Möglichkeiten der Sequenzierung mit Tandem-Massenspektrometrie sind dadurch eingeschränkt, daß 1) viele Peptide in nur geringem Maße fragmentieren, 2) die Interpretation von Tandem-Spektren häufig nicht trivial und eindeutig ist und 3) die Anwendbarkeit im allgemeinen auf Peptide mit Molmassen von maximal 3000–4000 u beschränkt ist^[7]. Nur durch die Fragmentierung höher geladener Ionen, wie sie beispielsweise bei ESI auftreten, können in manchen Fällen auch Sequenzinformationen über noch größere Peptide und selbst Proteine erhalten werden^[8]. Meistens jedoch werden größere Peptide vor der massenspektrometrischen Analyse durch chemischen oder enzymatischen Abbau in kleinere Peptide gespalten.

Massenspektrometrische Sequenzierungsverfahren eignen sich auch für die Sequenzierung N-terminal blockierter Peptide und für die Bestimmung von posttranslationalen Modifizierungsstellen (Acylierung, Phosphorylierung, Glykosylierung, Farnesylierung etc.). Die Unterscheidung der Aminosäuren Isoleucin und Leucin, die die gleiche Nominalmasse aufweisen (isobare Peptide), gelingt durch Hochenergie-CID in einem Viersektor-Gerät aufgrund ihres unterschiedlichen Seitenkettenfragmentierungsmusters^[7]. Lysin-Reste lassen sich nach Acetylierung der ϵ -Aminogruppe von isobaren Glutamin-Resten unterscheiden^[7].

Die neue Methode der Sequenzierung von Peptiden über metastabile Ionen in einem Flugzeitmassenspektrometer ist sehr vielversprechend^[9]. Diese Technik ermöglicht aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit Sequenzierungen im Femtomolbereich.

Einige neuere Arbeiten beschäftigen sich mit der Kombination von Edman-Abbau und Massenspektrometrie. Grundgedanke dabei ist es, vor allem die langsame HPLC-Analyse der PTH-Aminosäure durch die schnellere massenspektrometrische Analyse zu ersetzen. Um eine Sequenz zu bestimmen, kann nach jedem Abbaucyclus entweder die Masse der abgespaltenen PTH-Aminosäure^[10] oder des verbleibenden Peptids^[11] ermittelt werden. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit bei der Detektion der abgespaltenen Aminosäure mit Elektrospray-Massenspektrometrie wurde vor kurzem ein mit einer quartären Ammoniumgruppe modifiziertes Edman-Reagens vorgestellt^[10].

Chait et al. führten kürzlich die interessante Methode der Leitersequenzierung ein^[12]. Diese beinhaltet zwei Schritte: 1. den chemischen Abbau des Proteins zu Peptidfragmenten, die sich jeweils um eine Aminosäure unterscheiden (Erzeugung der Peptidleiter); 2. das Ablesen der Sequenz aus dem MALDI-Massenspektrum, die sich aus der Differenz zwischen aufeinanderfolgenden Massenpeaks ergibt. Um die Leiter zu erzeugen, wird der schrittweise Edman-Abbau mit Phenylisothiocyanat in Gegenwart von Phenylisocyanat als terminierendem Reagens durchgeführt (Verhältnis von Phenylisothiocyanat zu Phenylisocyanat etwa 95:5). Das Phenylcarbamoyl-Peptid (PC-Peptid) 6 ist im sauren stabil, während das Phenylthiocarbamoyl-Peptid 1 abgebaut wird (siehe Abb. 1). In jedem Cyclus wird so eine kleine Menge an Peptid durch PhNCO N-terminal blockiert und dem weiteren Edman-Abbau entzogen. Gleichzeitig wird eine definierte Zahl von Abbau-Cyclen 1–5 durchlaufen, ohne die mit PhNCS gebildeten Reaktionsprodukte zu isolieren und zu analysieren. Erst am Schluß wird ein MALDI-Massenspektrum der gesamten Mischung aufgenommen. Das Spektrum enthält die Massenpeaks der einzelnen Phenylcarbamoyl-Peptide 6. Die Massendifferenz zwischen aufeinanderfolgenden Peaks entspricht einem Aminosäurerest, die Reihenfolge ihres Auftretens definiert die Sequenz der ursprünglichen Peptidkette (Abb. 2).

Das Ablesen der gesamten Sequenz in einem Schritt erfolgt ähnlich wie bei der DNA-Sequenzierung durch Kettenfragmentierung nach Maxam und Gilbert^[13] und beschleunigt die Sequenzierung wesentlich. Da das Restpeptid und nicht die abgespaltene Aminosäure nachgewiesen wird, kann auf den säurekatalysierten Konvertierungsschritt (1 M HCl oder 25 % Trifluoressigsäure, ca. 60 °C) zur stabilen PTH-Aminosäure verzichtet werden (vgl. Abb. 1). Dadurch bleiben säureempfindli-

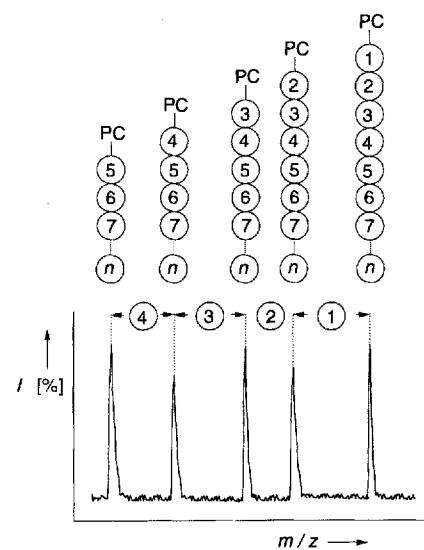


Abb. 2. Ablesen einer Partialsequenz aus einem Peptid mit n Aminosäuren Länge über das MALDI-Massenspektrum (PC = Phenylcarbamoyl). Die Massendifferenz zwischen benachbarten Massenpeaks entspricht einem bestimmten Aminosäurerest (auch modifizierte oder ungewöhnliche Reste können bestimmt werden; Reste mit gleicher Nominalmasse können nicht unterschieden werden). Die Ableserichtung der Sequenz erfolgt von großen zu kleineren Massen, aufgrund des chemischen Abbauprozesses also vom N- zum C-Terminus.

che phosphorylierte Aminosäuren wie Phosphoserin erhalten und können direkt über die entsprechende Massendifferenz im Spektrum nachgewiesen werden. Ein weiterer Vorteil ist, daß die Reaktionsausbeute nicht so hoch sein muß wie beim herkömmlichen Edman-Abbau. Alle Peptide sollten vor der massenspektrometrischen Analyse jedoch quantitativ als Carbamoylpeptide vorliegen, was durch eine nochmalige Umsetzung der am Schluß vorliegenden Reaktionsmischung mit Phenylisocyanat gewährleistet wird.

Daß sich MALDI-Massenspektrometrie prinzipiell für diese Art von Mischungsanalyse eignet, konnte am Beispiel von synthetischen Peptidmischungen bestehend aus über 30 Peptiden gezeigt werden^[12]. Obwohl massenspektrometrische Diskriminierungseffekte bei Oberflächenionisierungstechniken häufig auftreten, ergab jede Komponente einen deutlichen Massenpeak; die totale Unterdrückung von einzelnen Komponenten wurde nicht beobachtet. Leitersequenzierung mit MALDI-Massenspektrometrie eignet sich auch für größere Peptide. Allerdings wächst die Ungenauigkeit der Bestimmung einzelner Reste mit wachsender Molmasse (bis zu 0.9 u bei Peptiden mit Molmassen > 3500 u)^[12]. So lassen sich aufgrund der begrenzten Massenauflösung die Reste Asp und Asn, Gln und Glu nicht mehr zweifelsfrei unterscheiden. Für die maximal sequenzierbare Länge eines Peptids gelten prinzipiell ähnliche Grenzen wie beim herkömmlichen automatischen Edman-Abbau (von den Autoren wird die Grenze bei etwa 60 Resten gesetzt). Dagegen kann ein wesentlich höherer Probendurchsatz erzielt werden.

Die Leitersequenzierung könnte zur Alternative zum langsameren Edman-Abbau im Proteinsequenator avancieren, wenn es gelingt, die Chemie im Mikromäßigstab durchzuführen und vollständig zu automatisieren. Daß dies prinzipiell möglich ist, konnte kürzlich gezeigt werden^[14]; die Peptidleiter wurde dabei in einem kommerziellen Proteinsequenator erzeugt. Durch sehr kurze Kontaktzeiten des Edman-Reagens mit dem Protein während des Abbauschritts wurde die Leiter interessanterweise auch

in Abwesenheit eines terminierenden Agens gebildet^[14]. Die hohe Empfindlichkeit im massenspektrometrischen Ableseschritt (unterer Femtomolbereich) ist nur nutzbar, wenn der chemische Abbau wenigstens im 10–100 Pikomolbereich gelingt.

Prinzipiell könnte auch Elektrospray-Ionisierung für die Massenbestimmung der Leiterpeptide eingesetzt werden, die sich ebenfalls hervorragend für die Mischungsanalyse eignet^[15]. Das bei dieser Technik übliche Auftreten mehrfachgeladener Ionen könnte das Ablesen der Sequenz jedoch komplizieren. Außerdem wird Elektrospray meist mit Quadrupolgeräten mit einer im Vergleich zu Flugzeitanalysatoren, die normalerweise mit MALDI kombiniert werden, etwas besseren Auflösung, aber begrenztem Massenbereich verwendet (*m/z* maximal 4000, meistens jedoch um 2000). Für die Sequenzierung größerer Peptide hat ein Flugzeitanalysator, der prinzipiell keine obere Massengrenze hat, Vorteile. Die rasante Entwicklung auf dem Gebiet der Flugzeitanalysatoren sowie die Verbesserung der Matrices und der Probenaufbereitung^[16] läßt schon in naher Zukunft eine wesentliche Verbesserung der Massengenauigkeit erwarten.

Die Entwicklung eines vollautomatischen Proteinsequenators mit massenspektrometrischer Detektion basierend auf der Chemie der Leitersequenzierung ist möglich. Es ist jedoch zu erwarten, daß die Kosten für ein solches Gerät aufgrund der derzeit relativ teuren Massenanalysatoren deutlich höher liegen werden als für herkömmliche mit HPLC ausgestatteten Sequenatoren. Trotzdem wären solche Geräte aufgrund des hohen Proben durchsatzes und der Möglichkeit, modifizierte Peptide oder Peptide mit ungewöhnlichen Aminosäuren zu sequenzieren, für den Peptid- und Proteinchemiker sehr interessant.

[1] a) P. Edman, G. Begg, *Eur. J. Biochem.* **1967**, *1*, 80–91; b) P. Edman, *Acta Chem. Scand.* **1950**, *4*, 283–293.

- [2] N. F. Totty, M. D. Waterfield, J. J. Hsuan, *Protein Sci.* **1992**, *1*, 1215–1224.
- [3] a) H. E. Meyer, E. Hoffmann-Posorske, H. Korte, L. M. G. Heilmeyer, *FEBS Lett.* **1986**, *204*, 61–66; b) H. E. Meyer, E. Hoffmann-Posorske, A. Donella-Deana, H. Korte, *Methods Enzymol.* **1991**, *201*, 206–224.
- [4] a) M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1987**, *78*, 53–68; b) M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299–2301; c) M. Karas, U. Bahr, A. Ingendoh, F. Hillenkamp, *Angew. Chem. 1989*, *101*, 805–806; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 760–761.
- [5] a) M. Yamashita, J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4451–4459; b) *ibid.* **1984**, *88*, 4671–4675; c) A. P. Bruins, T. R. Covey, J. D. Henion, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2642–2646.
- [6] *Mass Spectrometry/Mass Spectrometry: Techniques and Applications in tandem-Mass Spectrometry* (Hrsg.: K. L. Busch, G. L. Glish, S. A. McLuckey), VCH, New York, 1988.
- [7] K. Biemann, *Methods Enzymol.* **1990**, *193*, 455–479.
- [8] a) C. J. Barinaga, C. G. Edmonds, H. R. Udseth, R. D. Smith, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1989**, *3*, 160–164; b) R. D. Smith, C. J. Barinaga, H. R. Udseth, *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 5019–5022; c) R. D. Smith, C. J. Barinaga, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1990**, *4*, 54–57; d) J. A. Loo, C. G. Edmonds, R. D. Smith, *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 2488–2499; e) K. J. Light-Wahl, J. A. Loo, C. G. Edmonds, R. D. Smith, H. E. Witkowska, C. H. L. Shakleton, C.-S. C. Wu, *Biol. Mass Spectrom.* **1993**, *22*, 112–120.
- [9] a) B. Spengler, D. Kirsch, R. Kaufmann, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 9678–9684; b) B. Spengler, D. Kirsch, R. Kaufmann, E. Jaeger, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, *6*, 105–108; c) R. Kaufmann, B. Spengler, F. Lützenkirchen, *ibid.* **1993**, *7*, 902–910.
- [10] R. Aebersold, E. H. Bures, M. Namchuk, M. H. Goghari, B. Shushan, T. C. Covey, *Protein Sci.* **1992**, *1*, 494–503.
- [11] I. Katakuse, T. Matsuo, H. Matsuda, Y. Shimonishi, Y.-M. Hong, Y. Izumi, *Biomed. Mass Spectrom.* **1982**, *9*, 64–68.
- [12] a) B. T. Chait, R. Wang, R. C. Beavis, S. B. H. Kent, *Science* **1993**, *262*, 89–92; b) *Proceedings of the 40th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics* **1992**, Washington, DC, May 31–June 5, 1939–1940.
- [13] A. M. Maxam, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 560–564.
- [14] R. Wang, S. Walker, R. C. Beavis, S. B. H. Kent, B. T. Chait, *Proceedings of the 41th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, **1993**, San Francisco, California, May 31–June 4, 658.
- [15] a) J. W. Metzger, K.-H. Wiesmüller, V. Gnau, J. Brünjes, G. Jung, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 901–903; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 894–896; b) J. W. Metzger, C. Kempter, K.-H. Wiesmüller, G. Jung, *Anal. Biochem.*, im Druck.
- [16] T. W. Hutchens, T.-T. Yip, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1993**, *7*, 576–580.

Ein Strukturmodell für den wasseroxidierenden Mangancluster im Photosystem II

Karl Wieghardt*

Höhere Pflanzen und Cyanobakterien können lichtgetriebene chemische Energie erzeugen. Bei der wasseroxidierenden Photosynthese^[1] findet diese Umwandlung durch lichtinduzierte, transmembrane Ladungstrennung von Protonen und Elektronen an den Reaktionszentren Photosystem I und Photosystem II (PS I, PS II) statt (Abb. 1), wobei die Oxidation von Wasser im aktiven Zentrum von PS II an einem – wahrscheinlich^[2] – vierkernigen Mangancluster abläuft [Gl. (a)]. Bahn-



[*] Prof. Dr. K. Wieghardt
Lehrstuhl für Anorganische Chemie I der Universität
Universitätsstraße 150, D-44780 Bochum
Telefax: Int. +234/7094-109

brechende Arbeiten von Joliot und Kok haben gezeigt^[3], daß die O_2 -Abspaltung periodisch nach jeweils vier Lichtblitzen erfolgt^[3]. Im Kokschen Katalysecyclus (Abb. 2) werden daher fünf Oxidationszustände des manganhaltigen Zentrums im PS II definiert, S_0 – S_4 , wobei die vier Oxidationsäquivalente schrittweise (Elektron für Elektron wird an PS I abgegeben) akkumuliert und gespeichert werden bis beim Übergang $\text{S}_4 \rightarrow \text{S}_0$ molekularer Sauerstoff abgespalten wird, und der Cyclus von vorne beginnt. Dieser für alles Leben auf unserem Planeten verantwortliche Cyclus (Bildung der O_2 -haltigen Atmosphäre) wird bis heute auf molekularer Ebene nicht verstanden, vor allem weil die Struktur des Manganclusters unbekannt ist. Auch die Rolle der essentiellen Cofaktoren, Chlorid- und Calcium-Ionen, ist nicht genau bekannt. Beide können aber durch Bromid- bzw. Strontium-Ionen ohne Funktionsverlust substituiert wer-