

# Neue massenspektrometrische Methoden zur Quantifizierung der Protein-Ligand-Assoziation in Lösung\*\*

Kathrin Breuker\*

## Stichwörter:

Analytische Chemie · Bindungsassays · Massenspektrometrie · Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Die Massenspektrometrie (MS) wurde kürzlich als alternative Technik zur quantitativen Charakterisierung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen in Lösung, d.h. zur Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten der Protein-Ligand-Assoziation ( $K_a$ ) oder -Dissoziation ( $K_d = 1/K_a$ ), vorgestellt. Drei solcher Ansätze werden hier betrachtet.<sup>[1-3,4]</sup> Allen ist gemein, dass Produkte von Protein-Ligand-Bindungsassays massenspektrometrisch analysiert werden, wodurch besondere Eigenschaften der MS wie Schnelligkeit und Empfindlichkeit genutzt werden. Die unterschiedlichen Strategien haben individuelle Vorteile, Grenzen und Möglichkeiten. Zwei dieser Methoden, SUPREX („stability of unpurified proteins from rates of H/D exchange“)<sup>[1]</sup> und PLIMSTEX („protein-ligand interactions in solution by MS, titration, and H/D exchange“),<sup>[2]</sup> basieren auf einem H-D-Austausch von Amid-Protonen des Proteinerückgrats in Lösung.<sup>[5]</sup> Die dritte Methode, von den Autoren als „kompetitive MS-Bindungsstudien“ benannt,<sup>[3]</sup> ähnelt kompetitiven Radioligand-Bindungsassays, nutzt aber MS zur Quantifizierung.

SUPREX greift auf die MALDI-Technik zurück (MALDI = Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisierung),<sup>[6]</sup> eine Methode mit relativ hoher Toleranz gegen Puffer, Salze und Kontamination durch kleine Moleküle,<sup>[7]</sup> die eine Probenaufreinigung entweder überflüssig macht, oder, in kritischen Fällen, auf die Verwendung von chromatographischen Pipettenspitzen (Zip-Tip) beschränkt.<sup>[1b]</sup> PLIMSTEX und die kompetitiven MS-Bindungsstudien nutzen ESI (Elektrospray-Ionisierung),<sup>[8]</sup> wobei die Proben durch Online-Umkehrphasenchromatographie gereinigt werden. Alle drei Methoden lassen somit die Verwendung von Puffern, Salzen und anderen kleinen Moleküle zu, die in biologischen Assays typischerweise vorhanden sind und die MS-Analyse stören könnten.

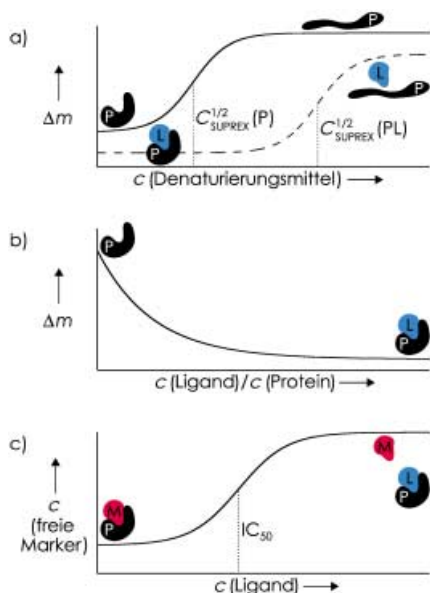
Mit SUPREX<sup>[1]</sup> wird im Prinzip die Stabilität von Proteinen gegen chemische Denaturierung gemessen, und zwar sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von einem oder mehreren Liganden; aufgezeichnet wird die Änderung des H-D-Austauschs bei der Zugabe von Harnstoff oder Guanidiniumchlorid. Die Freilegung von ursprünglich vergrabenen Amid-Protonen des Proteinerückgrats durch Denaturierung macht diese zugänglich für einen H-D-Austausch. Die Zunahme der Proteinmasse durch H-D-Austausch wird gegen die Konzentration an Denaturierungsmittel aufgetragen. An die so erhaltenen SUPREX-Kurven werden sigmoidale Funktionen angepasst, aus denen  $C_{\text{SUPREX}}^{1/2}$ -Werte (Konzentration an Denaturierungsmittel im Mittelpunkt

des Übergangs, Abbildung 1a) erhalten werden. Die  $C_{\text{SUPREX}}^{1/2}$ -Werte für Protein-Ligand-Komplexe waren größer als die für Protein allein, was eine bindungsinduzierte Stabilisierung aufzeigt. Aus  $C_{\text{SUPREX}}^{1/2}$ -Werten bei unterschiedlichen Austauschzeiten (zwischen wenigen Minuten und mehreren Stunden) wurden Gibbs-Faltungsenthalpien ( $\Delta G_f$ ) bestimmt und aus der Differenz von  $\Delta G_f$  des Proteins in An- und Abwesenheit von Ligand(en) der  $K_d$ -Wert berechnet. Die Auswertung setzt voraus, dass der H-D-Austausch am Protein unter EX2-Bedingungen abläuft (Entfaltungsgeschwindigkeit  $\ll$  Rückfaltungsgeschwindigkeit  $\gg$  H-D-Austauschgeschwindigkeit)<sup>[5a]</sup> und das Entfalten ein Zweizustandsprozess ist (d.h. keine intermediären Faltungszustände auftreten). Innerhalb dieser Grenzen kann SUPREX zur Bestimmung von  $\Delta G_f$  von Proteinen und Proteinkomplexen und Dissoziationskonstanten von Proteinkomplexen eingesetzt werden. Potenziell können aus SUPREX-Experimenten mit unterschiedlicher Ligandenkonzentration unbekannte Komplexstöchiometrien bestimmt werden.<sup>[1]</sup> SUPREX-Bindungskonstanten stimmen im Allgemeinen mit Werten aus anderen Methoden innerhalb von Faktor 3 überein – mit einigen stärkeren Abweichungen von bis zu 16 in vier von dreizehn Fällen (Tabelle 1).

PLIMSTEX<sup>[2]</sup> beruht auf einer Änderung des H-D-Austauschs bei der Gleichgewichtstitration des Proteins mit Ligand, wobei Positionsänderungen im Massenspektrum (d.h. Änderungen der  $m/z$ -Werte des Proteins) detektiert

[\*] Dr. K. Breuker  
Institut für Organische Chemie  
Universität Innsbruck  
Innrain 52a, 6020 Innsbruck (Österreich)  
Fax: (+43) 512-507-2892  
E-mail: kbreuker@gmx.net

[\*\*] Die Autorin dankt dem österreichischen Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF-Projekt P15767).



**Abbildung 1.** Messprinzip bei SUPREX, PLIMSTEX und der kompetitiven MS-Bindungsstudie. a) Bei der SUPREX-Analyse wird die Zunahme der Masse ( $\Delta m$ ) durch H-D-Austausch von Amid-Protonen am Protein (P, durchgezogene Kurve) und am Protein-Ligand-Komplex (PL, gestrichelte Kurve) nach einer bestimmten Austauschzeit gegen die Konzentration an Denaturierungsmittel aufgetragen. Der Übergang von kleinen zu großen  $\Delta m$ -Werten spiegelt den Übergang von gefalteten in entfaltete Zustände von Protein oder Protein-Ligand-Komplexen in Lösung wider, da mit zunehmender Konzentration an Denaturierungsmittel mehr Amid-Protonen für den H-D-Austausch zugänglich werden. b) Bei der PLIMSTEX-Analyse wird die Zunahme der Masse ( $\Delta m$ ) aus dem H-D-Austausch der Amid-Protonen des Proteins (P) gegen die Gesamtkonzentration an Ligand (L) (normiert auf die festgehaltene Gesamtproteinkonzentration) aufgetragen. Der H-D-Austausch wurde in diesem Experiment über mehrere Stunden fortgesetzt, bis nahezu ein Fließgleichgewicht erreicht war. Typischerweise sinken die  $\Delta m$ -Werte mit steigender Ligandenkonzentration, infolge einer zunehmenden Abschirmung von Amid-Protonen des Proteinerückgrats bei Bildung des Protein-Ligand-Komplexes. c) In der kompetitiven MS-Bindungsstudie verursacht die kompetitive Bindung des Liganden L an das Protein P die Freisetzung des Markers M aus dem Protein-Marker-Komplex. Der freie Marker wird durch Zentrifugation vom Assay getrennt und mit MS quantifiziert. Zur Datenanalyse werden Gleichgewichtskonzentrationen von freiem Marker gegen die Konzentration von konkurrierendem Liganden aufgetragen.

werden. Durch Auftragung der Deuteriumaufnahme gegen die Gesamtkonzentration an Ligand (normiert auf die festgehaltene Gesamtproteinkonzentra-

tion) wird eine PLIMSTEX-Kurve erstellt (Abbildung 1b). Typischerweise nimmt die Deuteriumaufnahme mit zunehmender Ligandenkonzentration ab, was die zunehmende Abschirmung von Amid-Protonen des Proteinerückgrats bei der Bildung des Protein-Ligand-Komplexes widerspiegelt. Ein von den Autoren entwickeltes „1:n protein:ligand sequential binding model“<sup>[2b]</sup> wurde an die Daten angepasst. Es beruht auf der Annahme, dass bis zu  $n$  identische Liganden sequenziell an ein Protein binden und der H-D-Austausch der einzelnen Amid-Protonen unabhängig voneinander ist. Die relativen Konzentrationen der beteiligten Spezies und die damit verbundene Deuteriumaufnahme wurden berechnet, und aus dem Kurvenangleich wurden Gleichgewichtskonstanten erhalten. Anders als SUPREX kann PLIMSTEX auch intermediäre Bindungszustände behandeln.<sup>[2a]</sup> PLIMSTEX-Bindungskonstanten stimmen mit Werten aus anderen Methoden innerhalb von Faktor 3.5 überein, solange die gesamte Proteinkonzentration nicht größer als ca.  $10 K_a$  (50  $K_a$  ergab einen Faktor 6.1). Bei sehr hohen Proteinkonzentrationen (ca. 5000  $K_a$ ) liefert PLIMSTEX keine zuverlässigen  $K_a$ -Werte, dennoch können solche Kurven zur Bestimmung von Komplexstöchiometrien genutzt werden.

Für die kompetitiven MS-Bindungsstudien<sup>[3]</sup> wird zunächst ein Markermolekül ausgewählt, das die gewünschte Bindungsstelle des Targetproteins mit hoher Affinität und Selektivität anspricht. Im Unterschied zu konventionellen Bindungsassays ermöglicht der massenspektrometrische Ansatz grundsätzlich die Verwendung von nativen, d.h. unmodifizierten, nichtmarkierten Markern. Der Protein-Marker-Komplex wird unterschiedlichen Mengen an Ligand, dessen Bindung zum Protein untersucht werden soll, ausgesetzt. Die kompetitive Bindung des Liganden an das Protein setzt den Marker frei, der durch Zentrifugation vom Assay getrennt und mit MS quantifiziert wird. Um detektierbare Unterschiede in der Konzentration an freiem Marker bei der Titration mit Ligand zu erhalten, wurden die Experimente unter Bedingungen durchgeführt, bei denen die „marker depletion“ beträchtlich war, d.h., die Konzentration an freigesetztem

Marker war wesentlich größer als die Konzentration an freiem Marker in Abwesenheit von konkurrierendem Ligand.<sup>[9]</sup> Die Gleichgewichtskonzentrationen an ungebundenem Marker wurden gegen die Ligandenkonzentrationen aufgetragen (Abbildung 1c), und eine sigmoidale Funktion wurde an die Daten angepasst. Aus den erhaltenen  $IC_{50}$ -Werten (der Ligandenkonzentration, die 50 % der spezifischen Protein-Marker-Bindung inhibiert) wurden  $K_d$ -Werte nach Goldstein und Barrett berechnet.<sup>[9]</sup> Diese Datenauswertung nimmt ein einfaches kompetitives Gleichgewicht an und setzt voraus, dass die Konzentration an freiem Liganden nicht signifikant durch die kompetitive Bindung beeinflusst wird. Bindungskonstanten aus kompetitiven MS-Bindungsstudien stimmen mit Werten aus Radioligand-Bindungsassays innerhalb von Faktor 2 überein.

Zusammengefasst sind die  $K_d$ -Werte aus den drei vorgestellten Methoden mit Referenzwerten aus anderen Methoden relativ gut in Einklang.<sup>[1–3]</sup> Die  $K_d$ -Werte aus den SUPREX-Experimenten waren mit einem mittleren Fehler von 36 % (Tabelle 1) am wenigsten präzise, dennoch wurde in den meisten Fällen eine vernünftige Übereinstimmung mit Referenzwerten erhalten. Die kompetitiven MS-Bindungsstudien ergaben im Mittel die beste Übereinstimmung mit Referenzwerten, allerdings waren die damit untersuchten Systeme sehr ähnlich (1:1-Bindung unterschiedlicher Inhibitoren mit dem gleichen Protein), wohingegen SUPREX und PLIMSTEX auch auf Systeme mit komplexerer Stöchiometrie und einer größeren Vielfalt an Bindungspartnern angewendet wurden (Tabelle 1). Ein bedeutender Vorteil von SUPREX und PLIMSTEX ist, dass diese Methoden *Proteine nach H-D-Austausch detektieren*. Die Analyse der partiell deuterierten Proteine durch MS/MS oder durch Proteinverdau mit anschließender MS ermöglicht die Charakterisierung von Strukturänderungen bei der Bindung von Ligand(en) und die Identifikation von Ligandbindungsstellen.<sup>[5]</sup> Andererseits ist ein bedeutender Vorteil der kompetitiven MS-Bindungsstudien, dass sie eben *nicht auf der Detektion von Proteinen* beruhen: Weil nur der Marker, nicht aber das Protein massenspektrometrisch detektiert wird,

**Tabelle 1:** Protein-Ligand-Systeme, die mit SUPREX, PLIMSTEX und „kompetitiven Bindungsstudien“ untersucht wurden.<sup>[a]</sup>

Methode	Komplex	System	$K_d$ (exp.) [nM]	Fehler [%]	Faktor <sup>[b]</sup>
SUPREX <sup>[c]</sup>	Protein-Protein, Protein-Peptid, Protein-Aminosäure-DNA-Duplex	TrpR + W + DNA (1:2:1)	0.16	± 56.3	1.6
		S-Protein + S-Peptid (1:1)	2.4	± 25	2.2
		S-Protein + S-Peptid (1:1)	34	± 35.3	5.4
		S-Protein + Sp8 (1:1)	400	± 17.5	9.8
		B1-Domäne + Fc-frag (1:1)	520	± 26.9	2.2
		FIVPr + TL3 (1:1)	520	± 63.5	12.7
		ablSH3 + prp4 (1:1)	$5.2 \times 10^3$	± 46.2	1.1
		S-Protein + Sp7 (1:1)	$9.7 \times 10^3$	± 30.9	1.4
		ablSH3 + prp3 (1:1)	$25 \times 10^3$	± 32	1.0
		ablSH3 + prp2 (1:1)	$28 \times 10^3$	± 28.6	1.0
		ablSH3 + prp1 (1:1)	$57 \times 10^3$	± 43.9	2.1
		TrpR + W (1:2)	$130 \times 10^3$	± 15.4	3.1
		S-Protein + Sp6 (1:1)	$250 \times 10^3$	± 44	15.6
				Ø ± 35.8	Ø 4.6
PLIMSTEX <sup>[d]</sup>	Protein-kleines Molekül, Protein-Metallionen, Protein-Metallionen-Peptid	Apo-CaM + $\text{Ca}^{2+}$ ( $K_3K_4$ )	0.2	± 8	2.5
		Holo-CaM + Melittin (1:1)	18.4	± 0.6	6.1
		I-FABP + Kaliumoleat (1:1)	385	± 7.7	1.1
		Apo-CaM + $\text{Ca}^{2+}$ ( $K_4$ )	$11.1 \times 10^3$	± 11.1	3.5
		Apo-CaM + $\text{Ca}^{2+}$ ( $K_3$ )	$18.5 \times 10^3$	± 9.3	1.4
		Ras-GDP + $\text{Mg}^{2+}$ (1:1)	$25 \times 10^3$	± 7.5	1.7
				Ø ± 7.4	Ø 2.7
kompetitive MS-Bindungsstudie <sup>[e]</sup>	Protein-Inhibitor	dD <sub>1</sub> r + SKF83566 (1:1)	1.9	± 15.8	1.4
		dD <sub>1</sub> r + (+)-Butaclamol (1:1)	11	± 9.1	2.0
		dD <sub>1</sub> r + Haloperidol (1:1)	220	± 27.3	2.0
		dD <sub>1</sub> r + Trifluoperazin (1:1)	460	± 8.7	2.1
		dD <sub>1</sub> r + Chlorpromazin (1:1)	620	± 1.6	2.0
		dD <sub>1</sub> r + Pimozid (1:1)	$4.7 \times 10^3$	± 4.3	1.9
				Ø ± 11.1	Ø 1.9

[a] TrpR: Trp-Repressor, W: L-Tryptophan, DNA: 25-Basenpaar-DNA-Duplex mit TrpR-kognitiver DNA-Sequenz, S-Protein: S-Protein-Komponente von RNase S vom Rind (Aminosäuren 21–124 der RNase A), S-Peptid: S-Peptid-Komponente der RNase S vom Rind (Aminosäuren 1–20 der RNase A), Sp6–Sp8: gekürzte S-Peptid-Mutanten, B1-Domäne: B1-Domäne von Protein G, Fc-frag: Fc-Fragment des IgG-Antikörpers von Säugern, FIVPr: Immunschwächevirus-Protease von Katzen, TL3: niedermolekularer Inhibitor, ablSH3: Src-homologe Domäne 3 der Abelson-Tyrosin-Kinase, prp1–prp4: Varianten von Prolin-reichen dekameren Peptiden, CaM: Calmodulin vom Schwein, I-FABP: Fettsäure bindendes Protein aus Rattendarm, Ras-GDP: GDP-gebundenes p21<sup>H-ras</sup>-Protein vom Mensch, dD<sub>1</sub>r: Dopamin-D<sub>1</sub>-Rezeptor aus der Membranfraktion des Schweinestriatums. [b] Faktor, um den die gemessenen  $K_d$ -Werte von den Werten aus anderen Methoden abweichen. [c] Aus Lit. [1a, b]. [d] Aus Lit. [2]. [e] Aus Lit. [3].

kann diese Strategie Proteine verwenden, die einer MS-Analyse nicht zugänglich sind (z. B. membrangebundene Proteine und solche mit sehr hoher Masse). Als gravierende Einschränkung erfordern kompetitive MS-Bindungsstudien einen Marker, der mit hoher Affinität und Selektivität an das Targetprotein bindet, sodass die Methode auf Ligand-Varianten einiger gut charakterisierter Systeme begrenzt ist. Außerdem setzt die Quantifizierung des Markers mit MS eine lineare MS-Antwort im betreffenden Konzentrationsbereich voraus, und die Prozedur zur Abtrennung des Markers vor der MS-Detektion könnte das Gleichgewicht stören. Eine bedeutende Einschränkung von SUPREX und PLIMSTEX ist die Massenobergrenze, bei der Unterschiede in der Proteinmasse durch H-D-Austausch

mit MS aufgelöst werden können. Auch wenn Proteinkomplexe mit Massen größer 2 MDa mit MS detektiert werden können,<sup>[10]</sup> haben die meisten Massenspektrometer keine ausreichende Massenauflösung und Massengenauigkeit zur Analyse des H-D-Austauschs in Proteinen großer Masse; die mit SUPREX and PLIMSTEX untersuchten Proteine wiesen Massen von unter 20 kDa auf. Durch Einsatz von ultrahochauflösenden Fouriertransformation-Massenspektrometern (FTMS), die Isotopensignale von Proteinen mit Molekulargewichten bis zu 112 kDa auflösen, könnte diese Massenobergrenze beträchtlich erhöht werden.<sup>[11]</sup>

Alle drei Methoden beruhen auf einer ausgeklügelten Datenanalyse, und die einzelnen Modelle zur Datenanpassung sollten in Bezug auf experi-

mentelle Bedingungen und die Komplexität des zu untersuchenden Systems kritisch geprüft werden. Zum Beispiel setzt SUPREX eine EX2-Austauschkinetik voraus; ein System, das einer EX1-Kinetik folgt, würde ein bimodales H-D-Austauschprofil aufweisen.<sup>[5a]</sup> Bei PLIMSTEX und den kompetitiven MS-Bindungsstudien sind die Protein- und Ligandenkonzentrationen im Assay kritische Größen.<sup>[2a,9]</sup> Allerdings sind eine geeignete Datenanalyse und die sorgfältige Abstimmung der experimentellen Parameter in allen Bindungsstudien erforderlich, nicht nur in massenspektrometrischen. Das Potenzial für Hochdurchsatz und Automatisierung, zusammen mit geringem Probenverbrauch, machen die Massenspektrometrie zu einem unverzichtbaren Werkzeug in der Proteomics-Forschung<sup>[12]</sup>

und zu einer attraktiven Wahl für quantitative Protein-Ligand-Bindungsstudien.

- 
- [1] a) K. D. Powell, M. C. Fitzgerald, *Biochemistry* **2003**, *42*, 4962–4970; b) K. D. Powell, S. Ghaemmaghami, M. Z. Wang, L. Ma, T. G. Oas, M. C. Fitzgerald, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10256–10257.
- [2] a) M. M. Zhu, D. L. Rempel, Z. Du, M. L. Gross, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5252–5253; b) eine ausführliche Beschreibung des Modells findet sich in: M. M. Zhu, D. L. Rempel, M. L. Gross, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, zur Veröffentlichung angenommen.
- [3] G. Höfner, K. T. Wanner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5235–5237.
- [4] Nicht diskutiert werden MS-Methoden zur Bestimmung von Gleichgewichtsbindungskonstanten durch Detektion von intakten gasförmigen Protein-Ligand-Komplexen; siehe z.B.: S. W. Bligh, T. Haley, P. N. Lowe, *J. Mol. Recognit.* **2003**, *16*, 139–147.
- [5] a) J. R. Engen, D. L. Smith, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 256A–265A; b) L. Wang, H. Pan, D. L. Smith, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 132–138; c) J. J. Englander, C. Del Mar, W. Li, S. W. Englander, J. S. Kim, D. D. Stranz, Y. Hamuro, V. L. Woods, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 7057–7062; d) J. G. Mandell, A. M. Falick, E. A. Komives, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3987–3995.
- [6] 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. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 760–761.
- [7] D. N. Nguyen, G. W. Becker, R. M. Riggin, *J. Chromatogr. A* **1995**, *705*, 21–45.
- [8] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **1989**, *246*, 64–71.
- [9] A. Goldstein, R. W. Barrett, *Mol. Pharmacol.* **1987**, *31*, 603–609; Erratum: A. Goldstein, R. W. Barrett, *Mol. Pharmacol.* **1988**, *33*, 720.
- [10] a) F. Sobott, C. V. Robinson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 729–734; b) S. Sanglier, E. Leize, A. V. Dorsselaer, F. Zal, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14*, 419–429.
- [11] a) A. G. Marshall, C. L. Hendrickson, S. D. H. Shi, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 252A–259A; b) A. G. Marshall, C. L. Hendrickson, G. S. Jackson, *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, *17*, 1–35; c) N. L. Kelleher, M. W. Senko, M. M. Siegel, F. W. McLafferty, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, *8*, 380–383.
- [12] R. Aebersold, M. Mann, *Nature* **2003**, *422*, 198–207.
-