

DOI: 10.1002/ange.200500668

Das thermische Entfalten von nativem Cytochrom *c* im Übergang von der Lösung in die Gasphase, untersucht mit Nativer Elektroneneinfang-Dissoziation**

Kathrin Breuker* und Fred W. McLafferty

Der Einfluss der Hydratation auf Struktur, Dynamik, Faltung und Stabilität von Proteinen ist über Jahrzehnte studiert worden und noch immer Gegenstand aktiver Forschung.^[1–4] Das Entfernen von Lösungsmittel führt zu stabilen Proteinkonformationen in der Gasphase, die sich drastisch vom ursprünglichen nativen Zustand unterscheiden können.^[5–9] Bisher ist allerdings nichts bekannt über die Abfolge von strukturellen Veränderungen in einem nativen Protein, das plötzlich von Vakuum umgeben ist. Wir untersuchen hier den Effekt der Hydratation auf Struktur und Stabilität und präsentieren erstmals detaillierte Daten zum thermischen Entfalten einer nativen Proteinstruktur im Übergang von der Lösung in die Gasphase. Unsere Daten sprechen für einen sequenziellen Entfaltungsmechanismus, der durch den Verlust hydrophober Bindungen dominiert ist.

Wir haben kürzlich gezeigt, dass Elektrospray-Ionisation (ESI)^[10] wässriger Lösungen von Eisen(III)-Cytochrom *c* ((Fe^{III})Cyt *c*) in Konzentrationen, die günstig für die Bildung von nichtkovalent gebundenen Homodimeren sind ($\approx 75 \mu\text{M}$), unerwartete Rückgratspaltungen produziert; wir nannten dieses Phänomen „Native Elektroneneinfang-Dissoziation“ (NECD; native electron capture dissociation).^[11] Der Prozess verläuft folgendermaßen: Wenn ein durch ESI erzeugtes Dimer-Ion in das Fourier-Transformations-Massenspektrometer (FTMS) eintritt und die geheizte Kapillare zur Desolvatation passiert, entfaltet eines der beiden Monomere partiell. Dies bewirkt einen Protonentransfer vom kompak-

ten Monomer **II** zum partiell entfalteten Monomer **I** und induziert eine beträchtliche Ladungsasymmetrie.^[12] Daraufhin findet ein intermolekularer Transfer von zwei Elektronen zum Häm von Monomer **I** statt, wobei eines der Elektronen das Häm-Eisen reduziert und das zweite Rückgratspaltungen des Proteins (NECD) neben Aminosäureresten bewirkt, die sich im Kontakt zum Häm befinden.^[11,13] Zuletzt separieren die beiden Spaltungsprodukte sowie Monomer **II** und werden in der Ionenzone des FTMS detektiert.

Abbildung 1 zeigt die Ausbeute^[14] an Fragment-Ionen aus NECD-Experimenten mit zwei wässrigen Lösungen von (Fe^{III})Cyt *c* (75 μM , pH 5) aus Pferdeherz, aufgetragen gegen die Spaltungsstelle im Proteinerückgrat; die Kapillartemperatur war ca. 31 °C.^[15] Die Lösungen A (für das in Abbildung 1a gezeigte Experiment) und B (Abbildung 1b) wurden auf die gleiche Weise hergestellt, nur dass A über Nacht und B drei Monate aufbewahrt wurde. In Einklang mit dem vorgeschlagenen NECD-Mechanismus^[11] finden Spaltungen des Proteinerückgrats neben Aminosäureresten statt, die in der nativen Struktur nichtkovalent an das Häm gebunden sind. Die NECD-Fragmente von Lösung A resultieren aus Spaltungen neben K13, Y48/T49, L68, K79/M80, F82 und I85, während Lösung B zusätzlich Produkte aus Spaltungen neben L35, T40, F46, N52 und W59 liefert.

Die Dimere in Lösung A und B scheinen daher unterschiedliche Strukturen zu haben, wobei die Struktur von Lösung B mehr Protein-Häm-Bindungen in Monomer **I** stabilisiert, sodass diese noch intakt sind, wenn NECD stattfindet.^[16] Die Verteilung der Spaltungsprodukte aus Lösung A ist konsistent damit, dass das Monomer **II** nahe K79/M80 von Monomer **I** bindet und seine Protein-Häm-Wechselwirkungen durch das Wasserstoffbrückennetz der Aminosäurereste 49, 67 und 78–82 stabilisiert (Abbildung 2). Die Produkte von Lösung B weisen auf eine Bindung nahe Y48/T49 von Monomer **I** hin, welche zusätzlich die Häm-Kontakte der Aminosäurereste im ausgedehnten Wasserstoffbrückennetz von 37, 38, 40, 49, 50, 52–55, 57 und 59 stabilisiert. Diese Bindung nahe Y48/T49 findet sich in der asymmetrischen Dimer-Einheit von (Fe^{III})Cyt *c*-Kristallen (Pferdeherz) bei niedriger Ionenstärke wieder, in der T47 und D50 von Monomer **I** mit V11, Q12 und Q16 von Monomer **II** binden.^[17] Interessanterweise hat dasjenige Kristallmonomer, das unserem teilweise entfalteten Monomer **I** entspricht, eine etwas weniger geordnete Struktur als das zweite Monomer.

Keines der NECD-Spektren zeigt Fragmente aus Spaltungen in den terminalen Bereichen, d. h. neben F10, L94 und L98, oder im Segment 18–34. Dies weist darauf hin, dass das anfängliche Entfalten, das die Ladungsasymmetrie in beiden Dimerstrukturen bewirkt, die Separation der terminalen Helices, das Öffnen der koordinativen H18-Fe-Bindung^[18] und das Entfalten der assoziierten Ω -Schleife umfasst. Der Protonentransfer zu den neu exponierten Aminosäureresten bewirkt eine Ladungsasymmetrie, deren Ausmaß aus der Summe der gemittelten Ladungen der quasi-komplementären Fragment-Ionen c_{48} und y_{56} , +8.5 (Abbildung 3a), und der gemittelten Ladung der Monomer-Ionen von +7.2 bei 50 % Ausbeute berechnet werden kann (die Monomer-Ionen sind alle Monomer **II**, da alle Monomer-I-Ionen fragmentiert

[*] Dr. K. Breuker
Institut für Organische Chemie und
Center for Molecular Biosciences Innsbruck (CMBI)
Universität Innsbruck
Innrain 52a, 6020 Innsbruck (Österreich)
Fax: (+43) 512-507-2892
E-mail: kbreuker@gmx.net
Prof. Dr. F. W. McLafferty
Department of Chemistry and Chemical Biology
Baker Laboratory
Cornell University
Ithaca, NY 14853-1301 (USA)

[**] Die Autoren danken dem österreichischen FWF und BMBWK (Projekte P15767 und T229, K.B.) und den NIH (Projekt GM16609, F.W.M.) für finanzielle Unterstützung sowie Huili Zhai, Cheng Lin, Xuemei Han, Robert Konrat, Harry B. Gray, Harold Hwang und Mi Jin für hilfreiche Diskussionen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

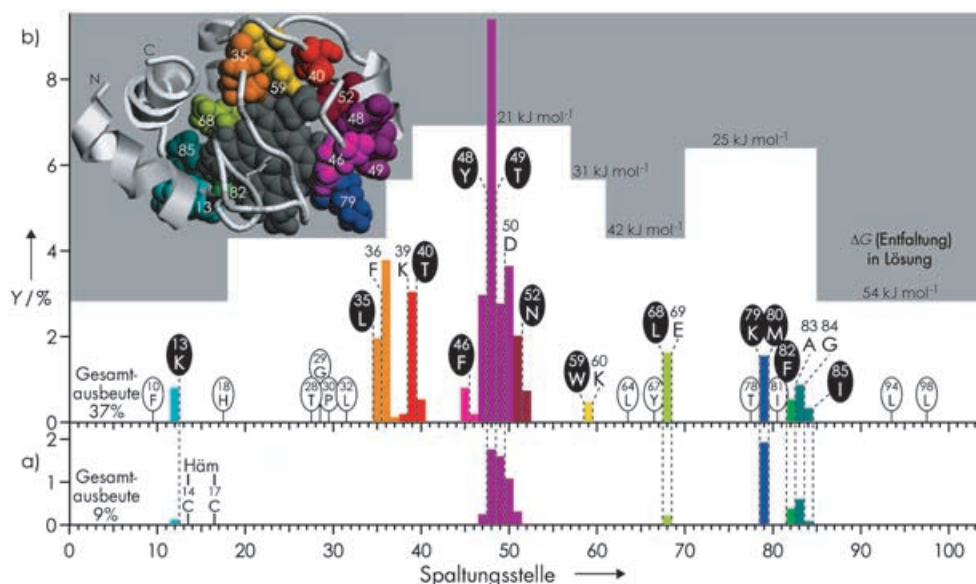


Abbildung 1. Ausbeute (Y) an Fragment-Ionen aus ESI-NECD-Experimenten mit wässrigen Lösungen von (Fe^{III})Cyt c (75 µM, pH 5) aus Pferdeherz; Auftragung von Y in Abhängigkeit von der Rückgratspaltungsstelle. Probenzubereitung durch Lösen des lyophilisierten Proteins in Nanopure-Wasser und a) Aufbewahrung bei 4 °C über Nacht, b) Aufbewahrung bei 4 °C über 3 Monate. Kapillartemperatur ca. 31 °C; Ellipsen: Aminosäurereste mit nativen Häm-Kontakten (schwarz gefüllt, wenn NECD beobachtet wurde). Oben links: Struktur von nativem (Fe^{III})Cyt c in Lösung;^[23] Häm: dunkelgrau; Häm-kontaktierende Aminosäurereste, die NECD unterliegen: gleiches Farbschema wie bei (a) und (b). Grauer Bereich: freie Entfaltungsenthalpien $\Delta G(\text{Entfaltung})$ von (Fe^{III})Cyt c in Lösung relativ zum nativen Zustand.^[21,22]

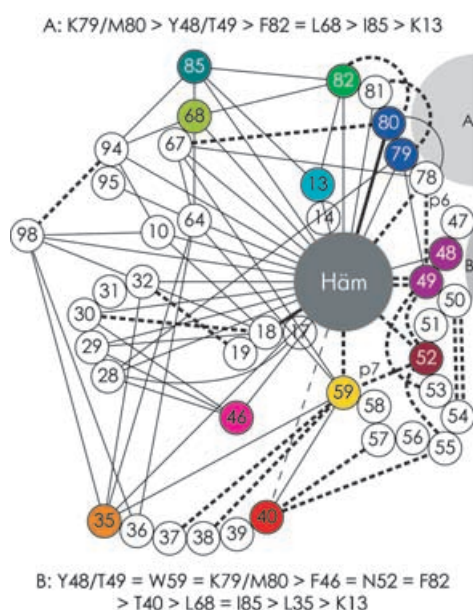


Abbildung 2. Schematische Darstellung von hydrophoben (dünne durchgezogene Linien), Wasserstoff- (breite gestrichelte Linien) und koordinativen (breite durchgezogene Linien) Bindungen (< 3.5 Å) der Häm-kontaktierenden Aminosäurereste in nativem (Fe^{III})Cyt c aus Pferdeherz.^[23] Die T40-Häm-Wechselwirkung (dünne gestrichelte Linie) ist unspezifisch, aber innerhalb 2.9 Å. N52 und W59 sind durch Wasserstoffbrücken mit einem Sauerstoffatom des Häm-Propionats 7 (p7) verbunden, T49 und T78 durch ein Sauerstoffatom des Häm-Propionats 6 (p6).

sind). Aus den Werten +8.5 und +7.2 ergeben sich unter Berücksichtigung der beiden Elektronen für die Reduktion des Häm-Eisens und die Rückgratspaltung jeweils die Werte

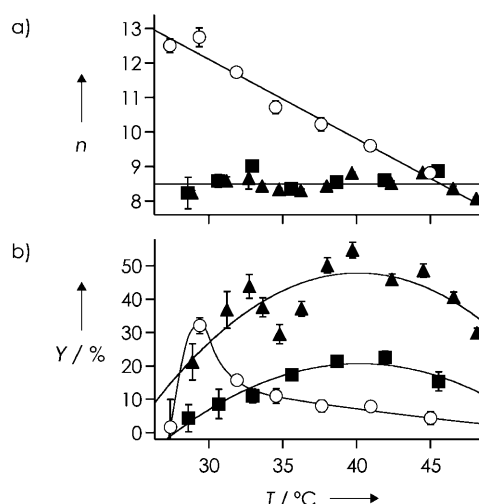


Abbildung 3. NECD von (Fe^{III})Cyt c-Lösungen in Abhängigkeit von der Kapillartemperatur: a) Summe der gemittelten Ladungen (n) von c_{48} und y_{56} ; b) Gesamtausbeuten (Y). Lösung A, pH 4 (○), pH 5 (■); Lösung B, pH 5 (▲).

+10.5 bzw. +5.2 für die Ladungen vor Elektronentransfer. Eine Ladungsasymmetrie von 2.0:1 bewirkt also NECD für die beiden auf pH 5 eingestellten Lösungen, unabhängig von der Temperatur (Abbildung 3a). Anders ist der Verlauf der absoluten NECD-Ausbeute: Diese steigt für Lösung A von 4 % bei 28.5 °C bis 23 % bei 42 °C und fällt dann auf 15 % bei 45.5 °C ab, für Lösung B steigt sie von 21 % bei 29 °C bis 54 % bei 40 °C und sinkt dann auf 30 % bei 48 °C (Abbildung 3b).

Eine 75 µM Lösung bei pH 4 ergab die gleichen Spaltungsprodukte wie in Abbildung 1 a, mit der Ausnahme, dass

keine Spaltung neben K13 beobachtet wurde. Die Summe der Ladungen der Fragment-Ionen war ca. +12.5 bei 27.5 und 29.5°C, was auf höher geladene gasförmige Dimere aus der Lösung mit pH 4 schließen lässt. Obwohl beim Erhitzen der Wert von ca. +12.5 auf den Wert der Lösung mit pH 5 (+8.5) sank (Abbildung 3a), änderte sich die Ladungsasymmetrie vor Elektronentransfer kaum mit der Temperatur; der Mittelwert von +8.9 für Monomere bei 29.5°C lässt auf eine Ladungsasymmetrie von ca. 14.5:6.9 (2.1:1) vor Elektronentransfer schließen. Die Temperaturerhöhung bewirkt zunächst eine drastisch steigende Ausbeute von 2% bei 27.5°C bis 32% bei 29.5°C und ein erneutes Absinken auf 4% bei 45°C (Abbildung 3b).

Dieser starke positive und negative Temperatureffekt auf die NECD-Ausbeute beider Dimer-Lösungen ohne Änderung der benötigten Ladungsasymmetrie ist Hinweis auf mehrere konkurrierende Dissoziationen der dimeren Lösungsstruktur. Der Reaktionsweg niedrigster Energie muss die direkte Dissoziation der intermonomeren Bindung sein, da unter keinen Bedingungen Dimer-Ionen in den NECD-Spektren detektiert wurden. Die zunehmende Ausbeute an NECD-Spaltungsprodukten mit steigender Temperatur ist dann konsistent mit dem zunehmend konkurrierenden Entfalten von Monomer I, wobei mehr Dimer-Ionen die kritische Ladungsasymmetrie für NECD erreichen, bevor die Bindung zwischen den Monomeren dissoziiert; NECD von Lösung B erreicht eine Ausbeute von 50% Fragment-Ionen bei 40°C; dies entspricht der vollständigen Fragmentierung aller Monomere I. Noch höhere Temperaturen eröffnen einen weiteren Reaktionspfad, nämlich das konkurrierende Entfalten von Monomer II, das den Anteil an Dimer-Ionen mit Ladungsasymmetrien unterhalb der kritischen Grenze erhöht. Es ist zu beachten, dass das weniger bevorzugte Entfalten von Monomer II konsistent ist mit der asymmetrischen Dimerstruktur der (Fe^{III})Cyt c-Kristalle,^[17] in der das Entfalten der terminalen Helices in Monomer II durch die Lage von V11, Q12 und Q16 in der Dimer-Bindungsfläche gehindert ist (Abbildung 1). Eine asymmetrische Dimerstruktur ist aber keine notwendige Voraussetzung für asymmetrisches Entfalten; viele gasförmige Dimer-Ionen weisen dieses Phänomen auf, obwohl bisher für keines NECD beobachtet wurde.^[12,19,20]

Das Produktverhältnis der an den unterschiedlichen Spaltungsstellen erzeugten Fragmente kann ebenfalls stark durch die Temperatur beeinflusst werden, wie es in Abbildung 4 am Beispiel von Lösung A illustriert ist. So nimmt z. B. die Ausbeute an Fragmenten durch Spaltung an Stelle 12, Y_{12} , relativ zur Ausbeute durch Spaltung an Stelle 84, Y_{84} , mit steigender Temperatur ab. Dies zeigt, dass es bei höheren Temperaturen weniger Dimere mit beibehaltener K13-Häm-Wechselwirkung als solche mit I85-Häm-Wechselwirkung gibt. Y_{68}/Y_{82} ändert sich nicht mit der Temperatur, was auf eine ähnliche Stabilität der L68-Häm- und F82-Häm-Wechselwirkungen schließen lässt. Zusammengefasst ergeben die Daten die Rangordnung der Stabilitäten und die umgekehrte Reihenfolge für das Entfalten: $K79/M80 > Y48/T49 > F82 = L68 > I85 > K13$. Für Lösung B findet man entsprechend: $Y48/T49 = W59/K79/M80 > F46 = N52 = F82 > T40 > L68 = I85 > L35 > K13$ (siehe Hintergrundinformationen).

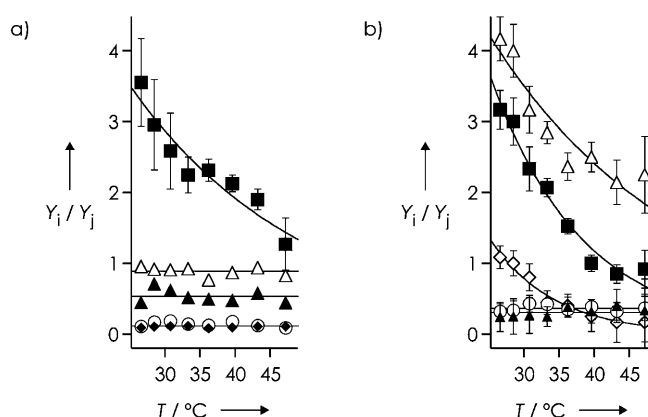


Abbildung 4. Produktverhältnisse Y_i/Y_j von NECD-Fragmenten aus Spaltung an den Stellen i und j für Lösung A (pH 5): a) Y_{47}/Y_{48} (◆), Y_{49}/Y_{48} (△), Y_{50}/Y_{48} (▲), Y_{51}/Y_{48} (○), $(Y_{47} + Y_{48} + Y_{49} + Y_{50} + Y_{51})/Y_{79}$ (■); b) Y_{82}/Y_{47} (■), Y_{83}/Y_{68} (△), Y_{84}/Y_{83} (▲), Y_{12}/Y_{84} (◇), Y_{68}/Y_{82} (○).

Nach dieser Rangordnung sind die stabilsten Bindungen zum Häm in Monomer I diejenigen, deren Lage als nah zur Dimer-Bindungsfläche postuliert wurde; dies gilt für Lösung A wie auch B (Abbildung 2). Trotzdem haben beide Dimere anfänglich auf die gleiche Weise entfaltet, wie durch das Fehlen von Fragmentierungen in den terminalen Bereichen und im Bereich 18–34 sowie durch die gleiche Ladungsasymmetrie in beiden Dimeren belegt ist. Aus Abbildung 2 ist ersichtlich, dass diese zuerst entfalten Bereiche generell durch hydrophobe Bindungen (durchgezogene Linien) stabilisiert sind, wohingegen die zuletzt entfaltenen Protein-Häm-Bindungen in Monomer I durch Wasserstoffbrücken (gestrichelte Linien) stabilisiert sind. Wie bereits vorgeschlagen,^[5–9] sollte das Entfernen von Wasser die hydrophoben Bindungen schwächen (kein zu vermeidendes Lösungsmittel), die Wasserstoffbrücken jedoch stärken (kein konkurrierendes Lösungsmittel).

Von weiterem Interesse ist, dass diese Stabilitätsordnung im Übergang von der Lösung in die Gasphase im Wesentlichen der Umkehrung des Entfaltens in Lösung entspricht. Engländer und Mitarbeiter haben kürzlich fünf kooperative Faltungs-Entfaltungs-Bereiche („Foldons“) in nativem Cyt c charakterisiert, deren freie Entfaltungsenthalpien in Abbildung 1 gezeigt sind ($K13 > L68 = L35 > W59 > K79/M80 = F82 = I85 > T40 = F46 = Y48/T49 = N52$).^[21,22] Das stabilste Foldon in Lösung umfasst die terminalen Helices, die durch hydrophobe Bindungen zusammengehalten sind. Im NECD-Experiment wurde keine Bindung des Häms mit F10, L94 und L98 gefunden; die nächst schwächste Bindung ist die zu K13. In Lösung stabilisieren mehrere hydrophobe Bindungen von den terminalen Helices (V20 mit F10, Y97, L98, A101; L32 mit L98) die Ω -Schleife 18–34 als Teil des zweitstabilsten Foldons. In diesem Bereich werden im NECD-Experiment L35 und L68 als die nächst schwächsten Bindungspartner des Häms gefunden, sechs weitere Spaltungsprodukte fehlen. Unter den stärksten Wechselwirkungen in der Gasphase findet sich andererseits die Y48/T49-Häm-Wechselwirkung, die Teil des am wenigsten stabilen Foldons in Lösung ist. Die Dehydratation der nativen Proteinstruktur, zusammen mit

der Stabilisierung durch Monomer **II**, invertiert nahezu die Stabilitäten der einzelnen Wechselwirkungen in Lösung.

Wir schließen daraus, dass in der Ordnung für das Entfalten eines nativen Proteins im Übergang von der Lösung in die Gasphase hydrophobe Bindungen stark favorisiert sind, sogar solche, die in Lösung zuletzt entfalten. Eine Umgebung aus Vakuum anstelle von Wasser schwächt solch eine Bindung natürlich; intermediäre Effekte dieser Art wurden bei Protein-Konformationen in unpolaren Lösungen beobachtet.^[24] Die wichtigste Voraussetzung für NECD der Cyt c-Dimere scheint das schnelle anfängliche Entfalten eines peripheren Bereichs zu sein, sodass monomere native Proteine mit peripheren hydrophoben Bindungen in ausgedehnten Strukturen auch auf NECD hin untersucht werden sollten. Obwohl die NECD-Ausbeuten hier erheblich durch das Fehlen einer Häm-Gruppe oder das konkurrierende Entfalten eines anderen Bereichs der Proteinstruktur reduziert sein könnten, wäre die konkurrierende Dissoziation von intermolekularen Bindungen (d.h. Dimer-Bindungen) kein Problem. Das Auftreten von NECD sollte auch in der Dissoziation von gasförmigen ionischen Dimerstrukturen, die asymmetrische Ladungsverteilungen aufweisen, gesucht werden.^[12,19,20]

Experimentelles

Die Experimente wurden an einem zuvor beschriebenen 6-Tesla-FTMS durchgeführt.^[25] Durch ESI erzeugte Ionen treten durch eine geheizte Kapillare in das Instrument ein, in der NECD stattfindet.^[11] Die Produkte werden mit Quadrupol-Ionenleitern in die Ionenzelle ($<10^{-9}$ Torr) transferiert. Zur ESI wurden selbstgezogene Emitterspitzen mit ca. 5 μm Innendurchmesser verwendet (Fluss 200–500 nL min⁻¹, 1 kV Spray-Potential). Cyt c aus Pferdeherz (Sigma, USA) wurde in Nanopure-Wasser gelöst und der pH-Wert mit Essigsäure eingestellt.

Eingegangen am 22. Februar 2005

Online veröffentlicht am 6. Juli 2005

Stichwörter: Hydratation · Massenspektrometrie · Native Elektroneneinfang-Dissoziation · Nichtkovalente Wechselwirkungen · Proteinstrukturen

- [12] J. C. Jurchen, E. R. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2817–2826.
- [13] NECD von (Fe^{II})Cyt c ergibt die gleichen Produkte durch Transfer von nur einem Elektron.
- [14] Die Ausbeute wurde berechnet als [Fragmente]/([Fragmente] + [Moleküliionen]); Dimer-Ionen wurden in den Massenspektren nicht detektiert.
- [15] Gemessen an der Kapillaröffnung; die Temperaturen im Innern der Kapillare sind proportional höher um einen geschätzten Faktor von 2.
- [16] Viele der für Lösung B gefundenen Spaltungsstellen sind in der Monomerstruktur in Abbildung 1 weit voneinander entfernt, sodass es in einer einzelnen Dimerstruktur nur für wenige dieser Stellen möglich wäre, an der intermolekulare Bindung teilzunehmen. Daher ist es unwahrscheinlich, dass ein direkter Elektronentransfer von Monomer **II** zur Spaltungsstelle NECD bewirkt. Multiple Dimerstrukturen sind auch weniger wahrscheinlich für Lösung B als für Lösung A, da die Dimere in Lösung B viel mehr Zeit hätten, eine Struktur minimaler Energie auszubilden.
- [17] R. Sanishvili, K. W. Volz, E. M. Westbrook, E. Margoliash, *Structure* **1995**, *3*, 707–716.
- [18] Der Verlust dieser Koordination erhöht die Elektronenaffinität des Häms.
- [19] C. Versluis, A. v. d. Staaij, E. Stokvis, A. J. R. Heck, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12*, 329–336.
- [20] N. Felitsyn, E. N. Kitova, J. S. Klassen, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13*, 1432–1442.
- [21] M. M. G. Krishna, Y. Lin, J. N. Rumbley, S. W. Englander, *J. Mol. Biol.* **2003**, *331*, 29–36.
- [22] H. Maity, M. Maity, S. W. Englander, *J. Mol. Biol.* **2004**, *343*, 223–233.
- [23] L. Banci, I. Bertini, H. B. Gray, C. Luchinat, T. Reddig, A. Rosato, P. Turano, *Biochemistry* **1997**, *36*, 9867–9877.
- [24] T. Knubovets, J. J. Osterhout, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *63*, 242–248.
- [25] R. A. Zubarev, D. M. Horn, E. K. Fridriksson, N. L. Kelleher, N. A. Kruger, M. A. Lewis, B. K. Carpenter, F. W. McLafferty, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 563–573.

- [1] M. F. Jarrold, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2000**, *51*, 179–207.
- [2] J. Woenckhaus, *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *213*, 9–24.
- [3] F. Franks, *Biophys. Chem.* **2002**, *96*, 117–127.
- [4] C. N. Pace, S. Trevino, E. Prabhakaran, J. M. Scholtz, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **2004**, *359*, 1225–1235.
- [5] F. W. McLafferty, Z. Q. Guan, U. Haupts, T. D. Wood, N. L. Kelleher, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4732–4740.
- [6] C. S. Hoaglund-Hyzer, A. E. Counterman, D. E. Clemmer, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 3037–3079.
- [7] D. M. Horn, K. Breuker, A. J. Frank, F. W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9792–9799.
- [8] K. Breuker, H.-B. Oh, D. M. Horn, B. A. Cerda, F. W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6407–6420.
- [9] H.-B. Oh, K. Breuker, S. K. Sze, Y. Ge, B. K. Carpenter, F. W. McLafferty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15863–15868.
- [10] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **1989**, *246*, 64–71.
- [11] K. Breuker, F. W. McLafferty, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5048–5052; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4900–4904.