

Isotopenmarkierte Photoaffinitätsreagentien und Massenspektrometrie zur Identifizierung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen**

Andrea Sinz*

Stichwörter:

Isotopenmarkierung · Massenspektrometrie · Photoaffinitätsmarkierung · Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Die Entdeckung neuer Arzneistoffe hängt wesentlich von der Entwicklung und Verbesserung schneller und verlässlicher Methoden ab, die ein Screening von Protein-Ligand-Wechselwirkungen ermöglichen. Eine wichtige Methode zum Studium von Wechselwirkungen zwischen biologisch aktiven, kleinen Molekülen und ihren Zielproteinen ist dabei die Photoaffinitätsmarkierung.^[1] Bei der Photoaffinitätsmarkierung wird durch Bestrahlung mit UV-Licht eine kovalente Bindung zwischen einem Liganden und einem Protein gebildet. Die Voraussetzungen für ein ideales Photoaffinitätsreagens sind chemische Stabilität vor der Photoaktivierung, leichte Photolyse bei Wellenlängen, die das Protein nicht beschädigen, sowie hohe Reaktivität des gebildeten Zwischenproduktes mit C-H-Gruppen

sowie mit nucleophilen X-Atomen aus X-H-Gruppen. Zudem sollten die Reaktionen des Photoaffinitätsreagens mit Proteinen zu stabilen und homogenen Produkten führen, um ihre Isolierung, Reinigung und nachfolgende massenspektrometrische Analyse zu ermöglichen. Eine reproduzierbare, hocheffizi-

ente Markierung von Zielproteinen gelingt mit Phenylaziden, Diazirinen und Benzophenon-Photophoren.^[2,3]

Für In-vivo-Studien von Protein-Protein-Wechselwirkungen wurden Diazirinringgruppen in die Aminosäuren Methionin, Leucin und Isoleucin eingeführt.^[4] Tri- oder tetrafunktionelle Pho-

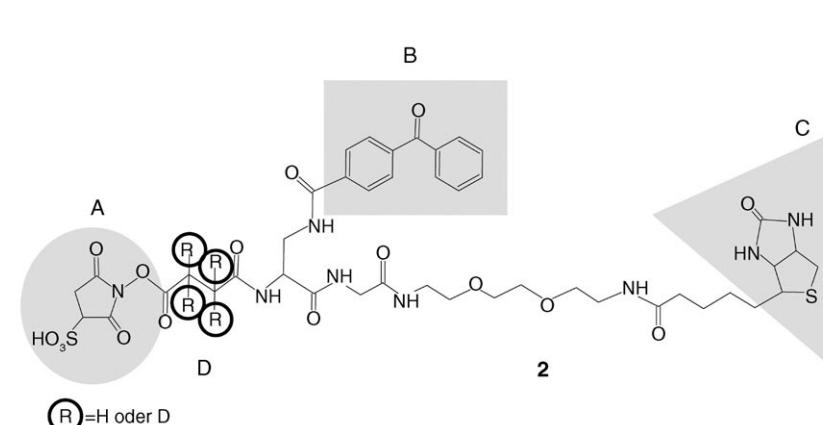
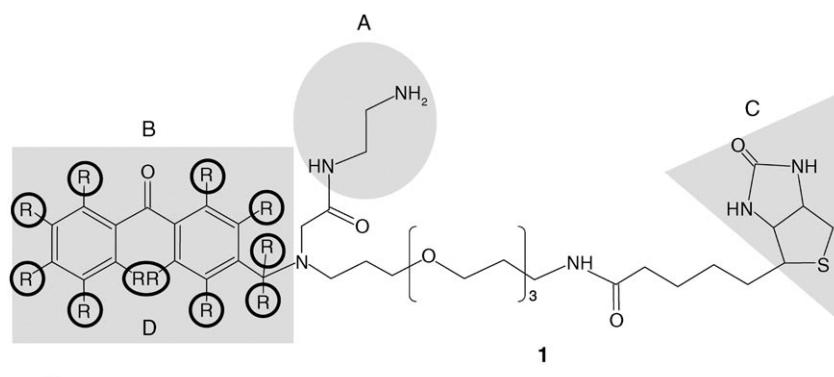


Abbildung 1. Isotopenmarkierte Photoaffinitätsreagentien **1**^[6] und **2**.^[7] Die verschiedenen Strukturelemente sind wie folgt bezeichnet: A) Reaktionsstelle 1 (grauer Kreis), B) Photoreaktionsstelle (graues Rechteck), C) Biotineinheit zur affinitätschromatographischen Reinigung (graues Dreieck) und D) Isotopenmarkierung (offener Kreis).

[*] Priv.-Doz. Dr. A. Sinz
Biotechnologisch-Biomedizinisches
Zentrum
Fakultät für Chemie und Mineralogie
Universität Leipzig
Linnéstraße 3
04103 Leipzig (Deutschland)
Fax: (+49) 341-973-6115
E-Mail: sinz@chemie.uni-leipzig.de
Homepage: <http://www.andreasinz.de>

[**] Die Nachwuchsgruppe von A.S. wird finanziell durch das Sächsische Ministerium für Wissenschaft und Kunst (SMWK), die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG-Projekt Si 867/7-1) und die Thermo Electron Corporation (Mattauch-Herzog-Förderpreis der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie an A.S.) unterstützt. A.S. dankt Prof. P. Welzel herzlich für das Korrekturlesen des Manuskripts und wertvolle Hinweise.

toaffinitätsreagentien, die eine Biotingruppe enthalten, ermöglichen eine Anreicherung der gebildeten Produkte durch affinitätschromatographische Reinigung an Avidin. Außerdem kann eine Spaltstelle im Molekül enthalten sein, um den Biotinrest freizusetzen.^[5]

Lamos et al. stellten kürzlich ein neuartiges Photoaffinitätsreagens **1** (Abbildung 1) vor, das folgende Komponenten enthält:^[6]

- A) eine reaktive Gruppe für die Kupplung des biologisch aktiven Liganden,
- B) eine photoreaktive Gruppe für die Reaktion mit dem Zielprotein,
- C) eine Biotingruppe zur affinitätschromatographischen Reinigung des Protein-Ligand-Komplexes an Avidin,
- D) eine stabile Isotopenmarkierung zur Erleichterung der massenspektrometrischen Identifizierung des Protein-Ligand-Komplexes.

Die Strukturmerkmale A–D sind auch in **2** vorhanden (Abbildung 1), das von Trester-Zedlitz et al. entwickelt wurde, um Protein-Protein-Wechselwirkungen durch chemische Vernetzung zu untersuchen.^[7] Allerdings beobachteten die Autoren eine geringe Kupplungseffizienz für **2** bei der Verknüpfung eines heterodimeren Proteinkomplexes sowie ein breites Spektrum an Vernetzungsprodukten.^[7]

Das Photoaffinitätsreagens **1**, mit dem Schlagwort „Target-Identification Probe (TIP)“ bedacht, wurde erfolgreich für die Identifizierung der Wechselwirkungsregion zwischen dem immunsuppressiven Wirkstoff Cyclosporin A (CsA) und seinem Bindungsprotein Cyclophilin (CypA) in Gegenwart der drei nicht an CsA bindenden Proteine Ovalbumin, Carboanhydrase und FK-bindendes Protein (FKBP) eingesetzt.^[6] Die Strategie ist in Abbildung 2 A dargestellt. Im ersten Schritt wird die 1:1-Mischung aus nichtdeuteriertem und deuteriertem Photoaffinitätsreagens an den bioaktiven Liganden gekuppelt. Nach der Kupplung wird das Konjugat mit einer Proteinmischung inkubiert, und durch Bestrahlung der Mischung mit langwelligem UV-Licht wird die Photoreaktion induziert. Nur das Zielprotein, das spezifisch mit dem Liganden wechselwirkt, geht die Photo-

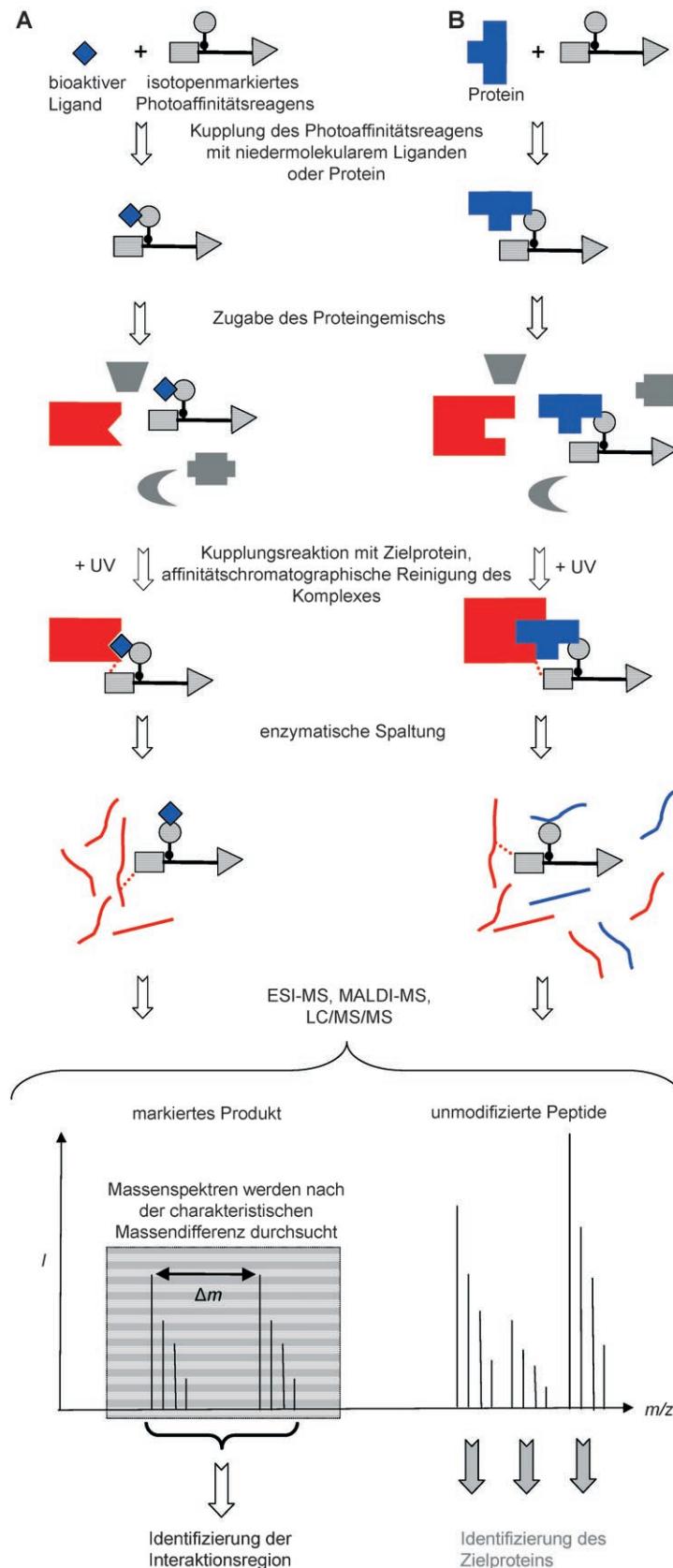


Abbildung 2. A) Strategie für die Analyse von Protein-Ligand-Wechselwirkungen unter Verwendung von **1** als 1:1-Gemisch des $[D_0]$ - und $[D_1]$ -Derivates, wie in Lit. [6] für die Analyse der CypA-CsA-Wechselwirkung dargestellt. B) Strategiekonzept für die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit Photoaffinitätsreagentien wie **1** oder **2**. Die Strukturelemente des Photoaffinitätsreagens sind schematisch analog zu Abbildung 1 dargestellt.

tovernetzung ein, nichtbindende Proteine bleiben unverändert. Der gebildete Protein-Ligand-Komplex wird durch Affinitätschromatographie an Avidin gereinigt und anschließend enzymatisch gespalten, z. B. durch Trypsin, das C-terminal an Lysin- und Arginin-Resten spaltet. Die Massenspektrometrie (MS) unter Verwendung der „sanften“ Ionisationsmethoden ESI (Elektrospray-Ionisation)^[8] oder MALDI (Matrix-assistierte Laser-Desorption/Ionisation)^[9] ermöglicht die Analyse der gebildeten Peptidgemische. MS ist die Methode der Wahl für die Analyse dieser komplexen Gemische, nicht zuletzt wegen ihrer hohen Geschwindigkeit und Empfindlichkeit, was sie besonders geeignet für eine Hochdurchsatzanalyse geringster Probenmengen macht. Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) kann durchgeführt werden, um Sequenzinformationen der proteolytischen Peptide des Zielproteins zu erhalten und um die Aminosäuren zu identifizieren, die durch die Photoaffinitätsmarkierung modifiziert wurden.^[6]

Die Anwendung des Photoaffinitätsreagens in einem festen Verhältnis aus nichtdeuteriertem und deuteriertem Derivat erleichtert die MS-Identifizierung von Peptid-Ligand-Addukten anhand der charakteristischen Isotopenmuster der modifizierten Peptide wesentlich. Signale, die wegen der durch die Isotopenmarkierung verursachten charakteristischen Massenänderung Addukten zwischen Peptiden des Zielproteins und dem Liganden zugeordnet wurden, liefern Informationen über die Ligandenbindungsstelle innerhalb des Zielproteins. Das Zielprotein einer bestimmten Liganden, das aus der Proteinmischung „gefischt“ wurde, indem der Ligand als „Köder“ eingesetzt wurde, wird anhand seiner unmodifizierten Peptide identifiziert (Abbildung 2).

Diese Strategie könnte dazu verwendet werden, nach Proteinbindungs-partnern eines Zielproteins zu suchen und die Wechselwirkungsregion(en) innerhalb des Protein-Protein-Komplexes zu kartographieren (Abbildung 2B). Für dieses Konzept gibt es jedoch bislang noch keine erfolgreiche Anwendung.

Die Kupplungseffizienz bei der Photoaffinitätsmarkierung mit **1**, das für die Analyse der Wechselwirkung zwi-

schen CypA und CsA verwendet wurde, ist relativ gering,^[6] was den Einsatz sehr empfindlicher analytischer Methoden für die Identifizierung der gebildeten Produkte nötig macht. Zudem kann die Komplexität der gebildeten Gemische die Analyse der Reaktionsprodukte der Photoaffinitätsmarkierung erschweren.

Der Einsatz von mit stabilen Isotopen (D, ¹⁸O, ¹³C) markierten Reagentien in einem festgelegten Verhältnis zu den nichtmarkierten Molekülen ermöglicht eine rasche Detektion der Reaktionsprodukte in den Massenspektren anhand der definierten Isotopenmuster, nachdem der Protein-Ligand-Komplex enzymatisch gespalten wurde.^[6,7,10] Man sollte sich allerdings darüber im Klaren sein, dass durch den Einbau einer Isotopenmarkierung die MS-Signalintensität eines spezifischen Reaktionsproduktes wegen der Aufspaltung des ursprünglichen Signals in zwei Signale reduziert wird. Bei **1** führt der Einbau von elf Deuteriumatomen zu einer großen Massenänderung im Reaktionsprodukt. Daher ist die charakteristische Massendifferenz zwischen nichtdeuterierter und deuterierter Spezies sogar in mehrfach geladenen Ionen, wie sie während des Elektrospray-Ionisationsprozesses entstehen können, sofort erkennbar.

Man könnte sich vorstellen, Photoaffinitätsreagentien, die eine große Zahl an schweren Isotopen enthalten, für die Analyse von Protein-Ligand-Komplexen in „Top-Down“-Ansätzen zu verwenden.^[11] Dabei werden die zu untersuchenden Proteine nicht enzymatisch gespalten, vielmehr werden die intakten Protein-Ligand-Komplexe innerhalb des Massenspektrometers fragmentiert. Fourier-Transformations-Ionencyclotronresonanz(FTICR)-^[11] oder Orbitrap-Massenspektrometer^[12] haben sich als besonders geeignet für „Top-Down“-Analysen erwiesen.

Der Einbau von Deuteriumatomen als Isotopenmarkierung hat den erheblichen Nachteil, dass deuterierte Moleküle andere Retentionszeiten als nichtdeuterierte Derivate während der flüssigkeitschromatographischen Trennung aufweisen können.^[13] Wenn die Zahl der Deuteriumatome im Molekül vergrößert wird, um die Massendifferenz zwischen deuteriertem und nichtdeuteriertem Derivat zu erhöhen, unterscheiden sich die Retentionszeiten der beiden

Spezies zunehmend, was die Bestimmung der Isotopenverhältnisse in den Massenspektren erschwert. Daher dürfte der Einbau von ¹³C- oder ¹⁸O-Atomen, die keine Isotopeneffekte während der LC/MS-Analyse aufweisen, vorteilhafter für das Design weiterer isotopenmarkierter Reagentien sein.^[14]

Die Strategie auf der Basis isotopenmarkierter Photoaffinitätsreagenzien in Kombination mit Massenspektrometrie ist, wie hier gezeigt, eine vielseitige und schnelle Methode zur Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen geringer Probenmengen.

Online veröffentlicht am 14. Dezember 2006

- [1] G. Dormán, G. D. Prestwich, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 64–76; T. Tomohiro, M. Hashimoto, Y. Hatanaka, *Chem. Rec.* **2005**, *5*, 385–395; Y. Sada-kane, Y. Hatanaka, *Anal. Sci.* **2006**, *12*, 209–218.
- [2] J. Brunner, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 483–514; T. L. Gilchrist, C. W. Rees, *Carbenes, Nitrenes, and Arynes, Studies in Modern Chemistry*, Nelson Publ., London, **1969**, S. 131.
- [3] P. J. A. Weber, A. G. Beck-Sickinger, *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 375–383.
- [4] M. Suchanek, A. Radzikowska, C. Thiele, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 261–267.
- [5] S. C. Alley, F. T. Ishmael, A. D. Jones, S. J. Benkovic, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6126–6127; M. Daghish, L. Hennig, M. Findeisen, S. Giesa, F. Schumer, H. Hennig, A. G. Beck-Sickinger, P. Welzel, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2404–2408; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2293–2296; G. B. Hurst, T. K. Lankford, S. J. Kennel, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 832–839; A. Sinz, S. Kalkhoff, C. Ihling, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 1921–1931.
- [6] S. M. Lamos, C. J. Krusemark, C. J. McGee, M. Scalf, L. M. Smith, P. J. Belshaw, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4435–4439; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4329–4333.
- [7] M. Trester-Zedlitz, K. Kamada, S. K. Burley, D. Fenyö, B. T. Chait, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2416–2425.
- [8] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **1989**, *246*, 64–71.
- [9] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1987**, *78*, 53–68; M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299–2301.

- [10] D. R. Müller, P. Schindler, H. Towbin, U. Wirth, H. Voshol, S. Hoving, M. O. Steinmetz, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1927–1934; K. M. Pearson, L. K. Pannell, H. M. Fales, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 149–159; C. J. Collins, B. Schilling, M. Young, G. Dollinger, R. K. Guy, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4023–4026; A. Schmidt, S. Kalkhof, C. Ihling, D. M. F. Cooper, A. Sinz, *Eur. J. Mass Spectrom.* **2005**, *11*, 525–534; E. V. Petrotchenko, V. K. Olkhovik, C. H. Borchers, *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4*, 1167–1179; C. Ihling, A. Schmidt, S. Kalkhof, D. M. Schulz, C. Stingl, K. Mechthler, M. Haack, A. G. Beck-Sickinger, D. M. F. Cooper, A. Sinz, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17*, 1110–1119.
- [11] N. L. Kelleher, H. Y. Lin, G. A. Valskovic, D. J. Aaserud, E. K. Fridrikson, A. Beavil, D. Holowka, H. J. Gould, B. Baird, F. W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 806–812.
- [12] B. Macek, L. Waanders, J. V. Olsen, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5*, 949–958.
- [13] F. E. Regnier, L. Riggs, R. Zhang, L. Xiong, P. Liu, A. Chakraborty, E. Seeley, C. Sioma, R. A. Thompson, *J. Mass Spectrom.* **2002**, *37*, 133–145.
- [14] J. Li, H. Steen, S. P. Gygi, *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, *2*, 1198–1204.

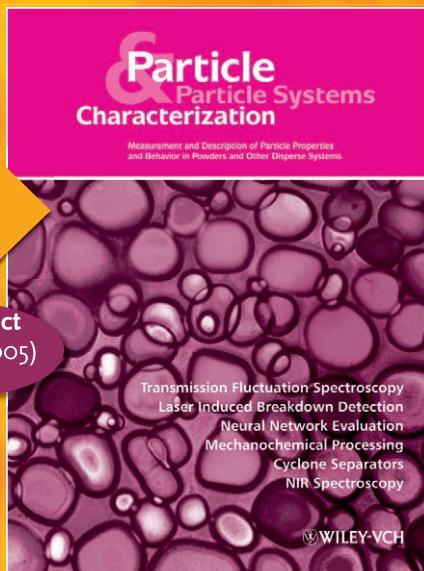
Particles From Every Angle

2006. Volume 23
6 issues per year.
ISSN Print 0934-0866
ISSN Online 1521-4117

Have a glance at one
of the top
journals in the field

ISI Impact
Factor (2005)
0.691

For more information or access to
an online sample copy, please visit:
www.ppsc-journal.com



Through the years *Particle & Particle Systems Characterization (PPSC)* has become the leading journal of its kind and the showcase for the cutting edge of theory and research.

PPSC attracts excellent works from all over materials science. The highly respected international Editorial and Advisory Boards provide you with one of the hardest hitting, scientifically sound journals available today.

■ **Special issue in 2006:**
X-Ray Powder Diffractometry

■ **Submit your manuscript by e-mail:**
ppsc-journal@wiley-vch.de

27792606_vo

For ordering information please contact:

John Wiley & Sons, Inc. • Fax: +1 201-748-5915
e-mail: subinfo@wiley.com • www.wiley.com

John Wiley & Sons, Ltd. • Fax: +44 (0) 1243-843232
e-mail: cs-journals@wiley.co.uk • www.wiley-europe.com

Wiley-VCH • Fax: +49 (0) 6201 606-184
e-mail: service@wiley-vch.de • www.wiley-vch.de

