

Proteinstrukturaufklärung in der Gasphase

Perdita E. Barran*

Gasphasenkonformationen · Massenspektrometrie ·
Proteinstrukturen · Strukturaufklärung

Die Massenspektrometrie (MS) wurde vor fast 100 Jahren von Thomson und Aston^[1] in den Cavendish Laboratories der Cambridge University entwickelt. Ursprünglich wurde die Gasphase des so genannten „Massenspektrographs“ als Versuchsumgebung für die Untersuchung des atomaren Aufbaus verwendet, da hierbei keinerlei Wechselwirkungen zwischen den Atomen störten. Ein Sprung ins Jahr 2010 zeigt, dass die Gasphase immer noch die Umgebung der Wahl für detaillierte Strukturanalysen ist, besonders seit dem Aufkommen der Elektrospray-Ionisierung (ESI)^[2] und der dadurch verbesserten Anwendbarkeit auf Biomakromoleküle.

Der besondere Vorteil der ESI ist, dass sie sich für hochmolekulare, schwerflüchtige Systeme eignet, solange diese löslich sind. Durch diese so genannte „sanfte“ Methode der Ionisierung werden komplexe, unsolvatisierte, biologische Moleküle ohne übermäßige Fragmentierung erhalten. ESI-MS wird in der Postgenomära weitgehend zur Bestimmung der Primärstruktur von Proteinen verwendet, kann aber auch Informationen über intramolekulare Wechselwirkungen und damit über die Proteinstruktur liefern. Die Massenspektrometrie hat sich mittlerweile als eine leistungsstarke Methode etabliert, mit der sich die Stöchiometrie sehr komplizierter Proteinkomplexe bestimmen und sich sogar der Aufbau^[3] und die Zusammenlagerung der Untereinheiten^[4] untersuchen lässt. Es gibt naturgemäß erhebliche Kontroversen darüber, ob eine Flüssigphasenstruktur in der lösungsmittelfreien Umgebung eines Massenspektrometers in ihrer Gesamtheit erhalten werden kann; allerdings können im Falle großer, makromolekularer Systeme, die durch zahlreiche nichtkovalente Wechselwirkungen zusammengehalten werden, viele makroskopische Eigenschaften der Lösungsstruktur und sogar der aktiven In-vivo-Struktur beibehalten werden. Als weitaus schwierigere Aufgabe entpuppt sich allerdings die Beantwortung der Frage, wie genau und für wie lange Strukturen auf atomarer Ebene stabil bleiben. Es finden sich immer mehr Hinweise darauf, dass diese Informationen durch Gasphasenuntersuchungen erhalten werden können^[5], und es könnte sogar sein, dass dynamische Vorgänge, die mit der intrinsischen Stabilität höher geordneter Strukturen zusammenhängen, am ehesten mithilfe der Massenspektrometrie aufgeklärt werden können.

Breuker und Mitarbeiter haben Fourier-transformierte Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometrie (FT-ICR-MS) eingesetzt, um das Dreihelixbündelprotein KIX zu untersuchen.^[6] Als Produkte der ESI kommen Proteine in unterschiedlichen Ladungszuständen vor. Im positiven Ionisierungsmodus sind die Ladungsträger üblicherweise Protonen. Das KIX-Protein liegt als Ion der Form $[M+nH]^{n+}$ vor, wobei n zwischen 7 und 16 liegt. Sobald das Protein im Grobvakuum des Massenspektrometers vorliegt, wird es durch einen Elektronenstrahl fragmentiert (Elektroneneinfangdissoziation, ECD). Diese Methode ist nicht ergodisch, d. h., dass die Energie zur Elektronenaufnahme lokal kompensiert wird, was dazu führt, dass die Spaltung schneller abläuft als die Schwingungsbewegungen der Bindungen. Folglich beeinflusst die ECD nicht die Struktur der Peptide und Proteine. Sie tendiert auch dazu, das Rückgrat des zu analysierenden Proteins selektiv zu spalten, wobei die Bindung zwischen dem Amidstickstoffatom und dem α -Kohlenstoffatom gebrochen wird. Dieser schnelle und gerichtete Spaltungsprozess kann manchmal zur weitgehenden Fragmentierung des Proteins führen, was zur Identifizierung und Lokalisierung von posttranslationalen Modifikationen verwendet werden kann.

Jeder Ladungszustand des KIX-Proteins erzeugt wegen des Elektronenstrahls, dem er ausgesetzt ist, eine charakteristische Signatur von Ionenfragmenten. In den Experimenten von Breuker et al. wird ein bestimmter Ladungszustand des Proteins isoliert, sodass dieser in der Ionenzone des FT-ICR-Massenspektrometers eingeschlossen ist. Anschließend wird dieses Protein für einen definierten Zeitraum dem Elektronenstrahl ausgesetzt, wodurch Fragmente des ausgewählten Ausgangsions entstehen und detektiert werden können. Für die niedrigsten Ladungszustände $n = 7-9$ wird eine sehr geringe Fragmentierung beobachtet, wogegen die Fragmentierung für Ionen mit 10 oder mehr Überschussprotonen erheblich zunimmt. Für jeden Ladungszustand werden geringfügig verschiedene Ionenfragmentierungsmuster erhalten. Deren Merkmale können, bezogen auf ihre Ladungsverteilung, in drei Bereiche unterteilt werden: $n = 7-9$, $n = 10/11$ und $n = 12-16$. Es ist wahrscheinlich, dass in diesen drei Regionen eine ähnliche Konformation vorliegt. Da nach jeder ESI die Zahl der auf einem Protein befindlichen Protonen steigt, wächst auch die Wahrscheinlichkeit, dass diese Protonen einander so nahe kommen, dass sie sich abstoßen und damit eine durch Coulomb-Kräfte angetriebene Entfaltung des Proteins verursachen – ein Effekt, der durch Ionenmobilitätsmessungen sehr gut belegt ist.^[7] Niedrige Ladungszustände repräsentieren sehr kompakte Konformationen des

[*] Dr. P. E. Barran
The School of Chemistry, The University of Edinburgh
Kings Buildings, Edinburgh (Großbritannien)
Fax: (+44) 131-650-6453
E-Mail: perdita.barran@ed.ac.uk

Proteins, höchstwahrscheinlich immer noch mit einer Faltung ähnlich der in Lösung, während diejenigen mit einer größeren Zahl an Protonen eher durch elektrostatische Abstoßung beeinträchtigt werden und länglicher sind. Da die hier untersuchten Ionen höherer Ladungszustände aus denaturierenden Lösungen zerstäubt werden, ist es möglich, dass ihre Gasphasenstrukturen denen in Lösung ähneln. Deshalb ist die Kartierung der beobachteten Ionenfragmente auf die Lösungsstruktur äußerst aufschlussreich. Die detektierten Fragmente werden aus Bereichen des Proteins kommen, die keine nichtkovalenten Bindungen aufweisen; oder anders ausgedrückt: aus Bereichen, die sich aus einer stabilen Faltung lösen oder denaturieren können.

Auf Grundlage der NMR-spektroskopisch aufgeklärten Struktur dieses Proteins in Lösung haben Breuker und Mitarbeiter postuliert, dass bis zu zehn Salzbrücken gebildet werden können, um die Struktur zu stabilisieren.^[6] Solche Salzbrücken könnten wahrscheinlich die Struktur, wie sie in Lösung vorliegt, als Folge der Dominanz elektrostatischer Wechselwirkungen unter lösungsmittelfreien Bedingungen aufrechterhalten. Die Struktur besteht aus einem kompakten Bündel aus α -Helices, wobei der N-Terminus in nichtkovalentem Kontakt mit der α_3 -Helix steht. Für das Ion mit $n=7$ wird nur eine sehr geringe Fragmentierung beobachtet, was darauf schließen lässt, dass Ionen dieses Ladungszustandes noch dieselbe Struktur wie in Lösung aufweisen. Breuker und Mitarbeiter berichten, dass die geringe Zahl an Ionenfragmenten alle vom N-Terminus und nicht von der Bündelregion herrühren, selbst bei vorhergehender Kollisionsaktivierung. Für das Ion mit $n=8$ werden die Spaltprodukte der ECD von den N-Termini der Helices α_1 und α_2 erhalten. Dies wurde auf den Beginn einer partiellen Entfaltung (anders als beim $n=7$ -Ion) zurückgeführt, wodurch die Helix α_1 ihre Verbindung mit dem Bündel verliert und beginnt, sich von ihrem ohnehin schon weniger strukturierten N-Terminus her zu entfalten (Abbildung 1). Wird ein weiteres Proton hinzugefügt, um ein Ion mit $n=9$ zu erhalten, kann eine stärkere Entfaltung der α_1 - und α_2 -Helices beobachtet werden. Viel erheblichere Veränderungen findet man für Ionen der Ladungszustände $n=10$ und $n=11$. Die erhaltenen Fragmente gehen nun aus Bereichen hervor, aus denen die α_2 - und α_3 -Helices entstammen, was darauf schließen lässt, dass diese bei den Ladungszuständen $n=7-9$ noch intakt sind, allerdings unter stärker denaturierenden Bedingungen keine definierten Helices mehr sind. Fragmente aus der α_3 -Helix liegen nach wie vor nur in geringen Mengen vor, was darauf schließen lässt, dass diese Helix teilweise erhalten bleibt, selbst in den vorliegenden, hohen Ladungszuständen. Nur bei Ionen mit $n=12-16$ wird eine wesentliche Menge an von der α_3 -Helix stammenden Spaltprodukten erhalten. Die Bewertung der Helixstabilität wurde über einen Vergleich der Fragmente aus jedem der drei helikalen Bereiche vorgenommen, wobei die Reihenfolge $\alpha_3 > \alpha_2 > \alpha_1$ für die Helixstabilitäten erhalten wurde. Diese Reihenfolge ist identisch mit derjenigen, die in Lösung erhalten wird.^[9]

Breuker et al.^[6] zeigen weiterhin, dass der geringe Fragmentierungsgrad von $n=7$ -Ionen selbst bei deren vier Sekunden langem Einfangen vor Beginn der ECD gering bleibt. Dies weist darauf hin, dass die kompakte Lösungsstruktur

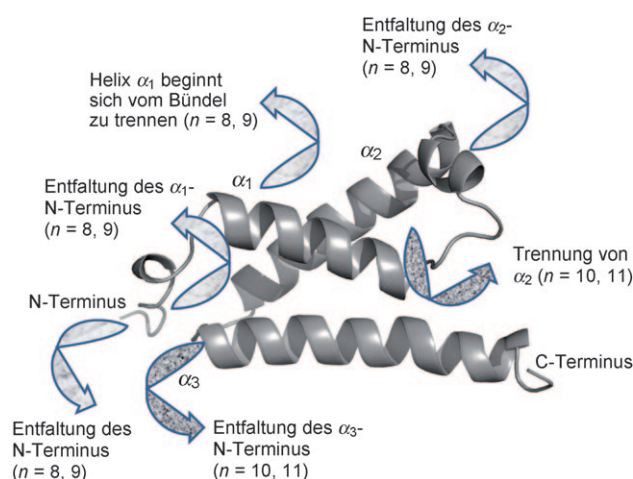


Abbildung 1. Struktur des KIX-Proteins^[8] in wässriger Lösung bei pH 5.5 und 27°C (pdb-Code: 2AGH, Modell 1). Abbildung adaptiert aus Lit. [6], um die Verringerung der Ordnung des Proteins in Lösung als Resultat der ECD-Fragmentierung zusammenzufassen. Die Fragmentierungsmuster der Ionen mit $n=8-11$ sprechen für einen Verlust der Tertiärstruktur, im Unterschied zum Muster des $n=7$ -Ions.

tur über einen beträchtlichen Zeitraum erhalten bleibt, auch wenn sie vorher einer Kollisionsaktivierung ausgesetzt wurde. Die nichtkovalenten Wechselwirkungen innerhalb dieses Drei-Helix-Proteins sind also stark genug, um den Verlust des Lösungsmittels, und damit des hydrophoben Zusammenhalts, zu kompensieren und die Proteinstruktur über einen langen Zeitraum in einer lösungsmittelfreien Umgebung aufrechtzuerhalten. Die postulierten Salzbrücken müssen eine dominante Rolle bei der Stabilisierung der Proteinstruktur in Abwesenheit eines Lösungsmittels spielen. Sie wären in den stabilsten Bereichen der Helix anzutreffen, wo die geringste Fragmentierung auftritt. Außerdem gibt es wahrscheinlich einen stabilisierenden Effekt durch die elektrischen Dipolmomente jeder einzelnen Helix, der sowohl auf Ladungs-Helix-Dipolwechselwirkungen als auch auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen den Helices zurückzuführen ist. Eine Analyse der Ladungsdichte in Lösung zeigte, dass die Stabilität der Helices größtenteils durch die Dichte der Salzbrücken bestimmt wird, wobei weitere elektrostatische Wechselwirkungen über neutrale und ionische Wasserstoffbrücken sowie über Dipolwechselwirkungen zur Stabilisierung beitragen.

Wie die Arbeit von Breuker et al. zeigt, liefert die Massenspektrometrie Informationen sowohl über makroskopische Eigenschaften, die aus der Tertiärstruktur hervorgehen, als auch über die Wechselwirkungen, die die Tertiärstruktur aufbauen. Es könnte also nun einen neuen Weg geben, die Struktur von Proteinen ermitteln. Bei der Auflösung von Proteinstrukturen auf atomarer Ebene hatte die Röntgenkristallographie lange Zeit eine Monopolstellung inne, allerdings kann sie keine der vielen Konformationsänderungen erfassen, die während der Proteinfaltung auftreten, da es praktisch unmöglich ist, Faltungsintermediate zu kristallisieren. Des Weiteren lassen sich mit kristallographischen Techniken keine vorübergehenden Strukturänderungen beobachten, die sich aus der Aktivität des Proteins ergeben. Die

NMR-Spektroskopie hat hier einige Erfolge zu verzeichnen, allerdings gibt es hier Einschränkungen bei der Charakterisierung sehr schnell ablaufender Faltungsschritte. Die NMR-Spektroskopie wird oft in Kombination mit Moleküldynamiksimulationen eingesetzt. Dabei werden experimentell aus langlebigen Zuständen bestimmte Ausgangskoordinaten genutzt, um die Strukturintermediate kurzlebiger Zustände abzuleiten. Computertechniken erleben einen Aufschwung als Methode zur Tertiärstrukturaufklärung, allerdings wurde das Hauptaugenmerk hier (zu recht) auf Modellsysteme gerichtet, und nur einige wenige „reale“ Systeme wurden durch ausschließliche Verwendung von Computertechniken gelöst.

Massenspektrometrietechniken ermöglichen, wie Breuker et al. demonstriert haben, die Bestimmung von Proteinstrukturen, die relevant für die jeweiligen Strukturen in Lösung sind, sowie die Untersuchung der Dynamik zwischen Sekundärstrukturelementen in Abwesenheit von jedweden Lösungsmittel.

Eingegangen am 17. November 2010
Online veröffentlicht am 2. März 2011

- [1] J. J. Thomson, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **1913**, 89, 1.
- [2] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **1989**, 246, 64.
- [3] M. Zhou, A. M. Sandercock, C. S. Fraser, G. Ridlova, E. Stephens, M. R. Schenauer, T. Yokoi-Fong, D. Barsky, J. A. Leary, J. W. Hershey, J. A. Doudna, C. V. Robinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 18139.
- [4] R. J. Rose, D. Verger, T. Daviter, H. Remaut, E. Paci, G. Waksman, A. E. Ashcroft, S. E. Radford, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 12873.
- [5] K. Breuker, F. W. McLafferty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 18145.
- [6] K. Breuker, S. Brüscheiler, M. Tollinger, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 903; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 873.
- [7] B. J. McCullough, J. Kalapothakis, H. Eastwood, P. Kemper, D. MacMillan, K. Taylor, J. Dorin, P. E. Barran, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 6336.
- [8] R. N. De Guzman, N. K. Goto, H. J. Dyson, P. E. Wright, *J. Mol. Biol.* **2006**, 355, 1005.
- [9] P. Schanda, B. Brutscher, R. Konrat, M. Tollinger, *J. Mol. Biol.* **2008**, 380, 726.