

Hypersensible Reaktion auf hyperreaktive Cysteine

Sascha Hoogendoorn, Lianne Willems, Bogdan Florea und Herman Overkleef*

Aktivitätsgestützte Profilerstellung · Cystein · Proteine ·

Proteomik

In den vergangenen Jahren wurden auf dem Gebiet der Proteomik dank der Entwicklung neuer Methoden für die Analyse der Expression, Funktion und Aktivität von Proteinen in komplexem biologischem Probenmaterial beträchtliche Fortschritte gemacht. Diese Ansätze ermöglichen nicht nur die Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen, sondern darüber hinaus auch die akkurate quantitative Erfassung von Proteinketten und -aktivitäten in nativen Proteomen. Quantitative Methoden der Proteomik (Abbildung 1a) bedienen sich entweder der Markierung mit stabilen Isotopen (z.B. ICAT, SILAC)^[1] oder nutzen markierungsfreie Techniken auf der Grundlage der Massenspektrometrie,^[2] um Proteine zu identifizieren und Expressionsniveaus quantitativ zu erfassen, die von Zelltyp zu Zelltyp und von Gewebe zu Gewebe sowie unter verschiedenen Bedingungen signifikanten Schwankungen unterliegen können. Darüber hinaus unterliegen die meisten Proteine posttranslationalen Modifizierungen wie Oxidationen, die ihre Funktion und Stabilität beeinflussen. Diese Modifizierungen sowie die Unterschiede verschiedener Proteome – zum Beispiel das eines gesunden und das eines kranken Gewebes – können mittels der quantitativen Proteomik analysiert werden.

Im Fall von Proteinen mit katalytischer Aktivität reichen Proteinhäufigkeituntersuchungen nicht aus, um Einsichten in die enzymatische Aktivität zu gewinnen, die für gewöhnlich vielfach reguliert ist. Es sind daher Methoden voneinander, mit denen Proteinaktivitäten direkt, also unabhängig von Proteinexpressionsniveaus, erfasst werden können. Die aktivitätsgestützte Proteinprofilerstellung (ABPP: Activity-Based Protein Profiling) erlaubt durch den Einsatz niedermolekularer aktivitätsgestützter Sonden (ABPs: Activity-Based Probes) die unmittelbare quantitative Messung der enzymatischen Aktivität.^[3] Die ABPs wechselwirken spezifisch mit der katalytisch aktiven Form eines Zielenzyms und lassen sich zum Zweck der Isolierung und Identifizierung im Massenspektrometer mit einer Affinitätsmarkierung versehen. Während traditionelle ABPP-Experimente auf die Identifizierung entweder aller markierten Proteine oder der nur von einer Sonde erfassten Fragmente aus aktiven Zentren abzie-

len, zielt das jüngst entwickelte Tandemverfahren aus orthogonaler Proteolyse und aktivitätsgestützter Proteinprofilerstellung (TOP-ABPP) auf die simultane Identifizierung von markierten Proteinen und Modifikationsstellen (Abbildung 1b).^[4]

Im Allgemeinen hängt die Reaktivität von Aminosäureseitenketten, die entweder eine katalytische Aktivität oder die Angreifbarkeit in einer posttranslationalen Modifizierung sein kann, in hohem Maße von der lokalen Mikroumgebung im Proteinmolekül ab. Es sind jedoch keine Konsensussequenzen bekannt, mit deren Hilfe sich hochreaktive Aminosäurereste systematisch erfassen und von ihren unreaktiven Gegenstücken abgrenzen ließen. Das verkompliziert die globale Identifizierung reaktiver Zentren in einem Proteom sowie die Annotierung neu entdeckter Proteine. Sowohl die ABPP als auch die quantitative Proteomik zielen auf bestimmte Untergruppen reaktiver Aminosäurereste, aber keiner der beiden Ansätze erfasst das „Gesamtreaktivitätsprofil“ eines Proteoms vollständig.

Von allen natürlichen Aminosäureresten wird die freie Thiolgruppe von Cystein als die reaktivste Gruppe erachtet, da sie stark nucleophil und sehr empfindlich gegen oxidative Modifizierung ist. Für die Untersuchung von Cysteinresten stehen mehrere thiolpezifische Markierungsreagentien zur Verfügung. Von diesen wird Iodacetamid (IA) in der quantitativen Proteomik häufig eingesetzt, bei der Cysteinreste in zwei verschiedenen Proteomen mit stöchiometrischen Mengen einer Leicht- bzw. Schwerisotopensonde markiert und die Unterschiede analysiert werden (Abbildung 1a).^[1]

Alternativ dazu kommen bei ABPP-Experimenten oftmals ABPs zum Einsatz, die ausschließlich katalytisch aktive Cysteinreste einer bestimmte Klasse oder Unterkategorie von Enzymen ansteuern. Die Selektivität erreicht man durch Feinabstimmung der Reaktivität der ABP in einer Weise, dass diese nur an bestimmten Stellen im Proteom reagiert und andere funktionelle Gruppen unbeeinflusst lässt. Ein Beispiel hierfür ist die aktivitätsgestützte Sonde DCG-04, die selektiv die Cysteinproteasen der Cathepsin-Familie markiert.^[5,6] Darüber hinaus wird die Nucleophilie ausgesuchter Cysteinreste durch Messung der pK_a -Werte oder der Geschwindigkeit ihrer Alkylierung durch bestimmte Elektrophile ermittelt, doch ist dies nur mit gereinigten Proteinen möglich,^[7] was eine offenkundige Limitierung dieses Ansatzes darstellt.

Jüngst haben Weerapana et al.^[8] eine Strategie für die direkte globale Quantifizierung der Reaktivität von Aminosäureseitenketten (insbesondere Cysteinresten) in natürlichem biologischem Proteinmaterial entwickelt. Dieser Ansatz ver-

[*] S. Hoogendoorn, L. Willems, Dr. B. Florea, Prof. Dr. H. Overkleef
Leiden Institute of Chemistry
and Netherlands Proteomics Centre
Gorlaeus Laboratories
Einsteinweg 55, 2333 CC Leiden (Niederlande)
Fax: (+31) 71-5274307
E-Mail: h.s.overkleef@chem.leidenuniv.nl

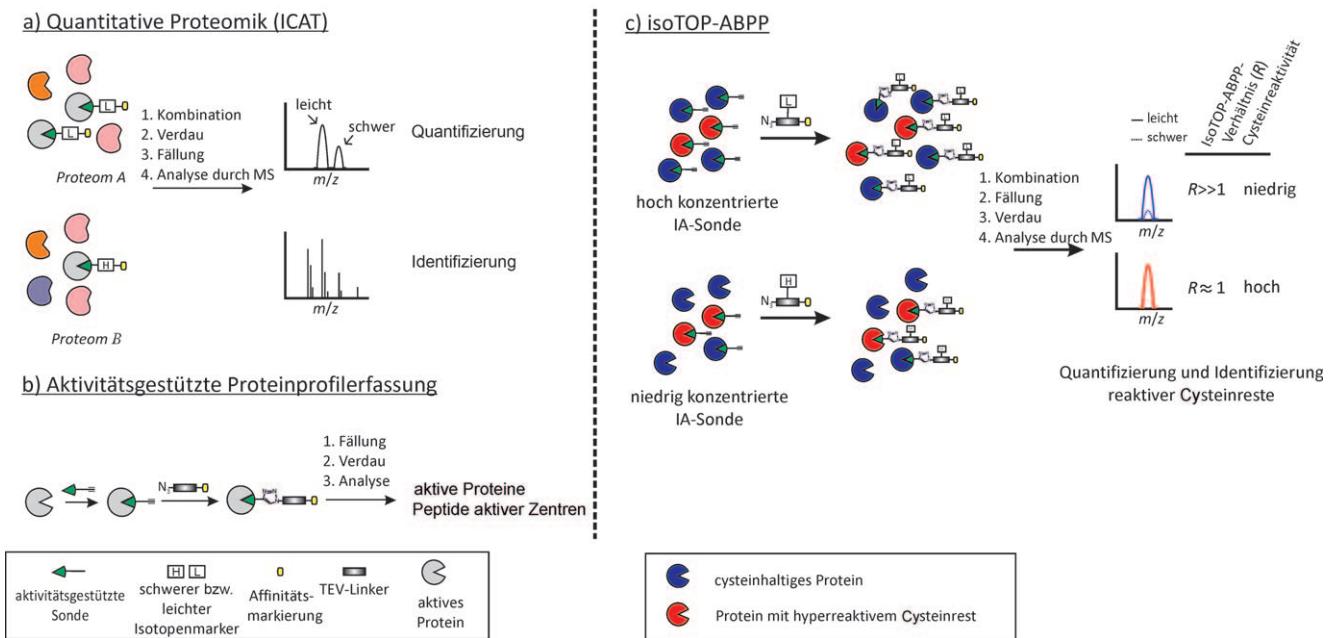


Abbildung 1. Schematische Darstellung von drei Techniken, die in der Proteomik zum Einsatz kommen. a) Die quantitative Proteomik vergleicht zwei Zustände eines Proteoms. Dies geschieht zumeist durch den Einsatz von Isotopenmarkierungen. b) Aktivitätsgestützte Proteinprofilerstellung zur Identifizierung aktiver Proteine und/oder von Fragmenten aus aktiven Zentren mithilfe von ABPs; TEV = Tabakätzvirus. c) Die isoTOP-ABPP-Methode erlaubt die Identifizierung funktioneller Cysteinreste mittels Quantifizierung ihrer Reaktivität gegenüber cysteinspezifischen Sonden.

bindet die Vorteile der TOP-ABPP mit denen der quantitativen Proteomik bei der Suche nach funktionellen Cysteinresten in komplexen Proteomen. Bei dieser isoTOP-ABPP (Abbildung 1c) genannten Methode wird die Alkin-Iodacetamin-Sonde (IA-Sonde) entweder an eine schwere oder an eine leichte Azido-TEV-Biotinmarkierung „angeklickt“. Man nimmt an, dass die Nucleophilie und somit die „Hyperreakтивität“ von Cysteinresten ihre Funktionalität widerspiegelt, und folgerte daher, dass hyperreaktive Cysteinreste durch die IA-Sonde in geringer Konzentration erschöpfend markiert werden, während die Markierung weniger reaktiver Cysteinreste konzentrationsabhängig erfolgt. Die Behandlung eines Proteoms mit der schweren IA-Sonde in geringer Konzentration und der leichten IA-Sonde in zunehmender Konzentration und die anschließende Anreicherung der markierten Proteine durch Streptavidin-Fällung, Trypsin- und TEV-Verdau sowie LC-MS/MS-Analyse ergibt daher für jedes markierte cysteinhaltige Peptid einen „Leicht/schwer“-Quotienten. Sehr reaktive Cysteinreste sollten einen isoTOP-ABPP-Quotienten $R_{[\text{leicht}:\text{schwer}]}$ von ungefähr 1 und weniger reaktive Cysteinreste einen von ≥ 1 aufweisen. Da diese Quotienten von der Reaktivität und nicht von der Proteinhäufigkeit abhängen und die IA-Sonde klein und zellgängig ist, kann diese Technik genutzt werden, um funktionelle Cysteinreste in nativen Proteomen zu untersuchen.

Weerapana et al. konnten zeigen, dass die isoTOP-ABPP-Quotienten einzelner Cysteinreste tatsächlich unabhängig von der Proteinmenge und dem Ursprungsgewebe sind. Darüber hinaus haben die Experimente ergeben, dass Peptide mit einem Quotienten $R_{[\text{light}:\text{heavy}]} < 2$ (für einen zehnfachen Überschuss an leichter gegenüber schwerer IA-Sonde) an

Cysteinresten angereichert sind, die als katalytisch aktiv, als Teil eines aktiven Zentrums oder als Angriffspunkt post-translationaler (oxidativer) Modifizierung gelten. Ein niedriger isoTOP-ABPP-Quotient von Cysteinen in noch uncharakterisierten Proteinen liefert wertvolle Informationen, die möglicherweise zur Aufklärung der Proteinfunktion beitragen können. Zusätzlich kann diese Methode genutzt werden, um die Funktionalität von am Computer entworfenen Proteinen in einer komplexen Mischung vorherzusagen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass sich mit einem eleganten, konzentrationsgestützten Ansatz Funktionalität und Reaktivität von Cysteinresten korrelieren lassen. Statt die Reaktivität der Sonde zu vermindern, um Selektivität zu erzielen (wie bei der ABPP), wird hier eine sehr reaktive Sonde in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, um Reste unterschiedlicher Reaktivität zu unterscheiden. Bei einer niedrigen Sondenkonzentration konkurrieren die Cysteinreste um die Reaktion mit der Sonde, was zu unterschiedlicher Markierung führt. Ein ähnlicher Ansatz wird in der organischen Chemie verfolgt, um zum Beispiel die relativen Reaktivitäten von Glycosyldonoren mithilfe eines gemeinsamen Aktivators zu ermitteln.^[9] Da jedoch die Markierung von Cysteinresten in hohem Maße auch von der Häufigkeit abhängt, nutzen Weerapana et al. das Verhältnis von hohen zu niedrigen Konzentrationen der leichten und der schweren Sonde statt die absolute Markierung zu quantifizieren.^[8]

Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, dass ein Teil der (funktionellen) Cysteinreste möglicherweise aus sterischen Gründen nicht durch die Sonde markiert wird. Andere Cysteinreste sind hinsichtlich ihrer Aktivität vielleicht von

Cofaktoren abhängig oder besitzen einen anderen Wirkmodus. Das Fehlen einer beobachtbaren Hyperreaktivität schließt daher eine Funktionalität nicht zwingend aus, während ihr Auftreten tatsächlich ein starker Indikator dafür ist, dass der betreffende Rest an einem funktionellen Vorgang beteiligt ist. Man kann davon ausgehen, dass sich die Anwendungsbreite dieser Methode mit einem anderen Satz elektrophiler Sonden, die auf einen anderen Teil des Proteoms abzielen, stark erweitern ließe. Gegenwärtig stehen jedoch nur sehr wenige allgemeine Reagenzien für andere funktionelle Gruppen als die Thiolgruppe zur Verfügung. Die Herausforderung für den Chemiker liegt somit in der Entwicklung solcher Reagenzien. Alternativ könnte diese Technik auf spezifische ABPs wie DCG-O4 erweitert werden. Stöchiometrische Mengen der Sonde würden die Enzymfamilie als Ganzes markieren, wohingegen niedrigere Konzentrationen der Sonde dazu genutzt werden könnten, tiefere Einsichten in die Aktivität einzelner Mitglieder der Familie unter verschiedenen Bedingungen zu erlangen. Dies würde beispielsweise die Abschätzung relativer Cathepsinaktivitäten in einer Situation ermöglichen, in der ihre konzertierte Wirkung bei der Prozessierung von antigenen MHC-Klasse-II-Peptiden untersucht wird.^[10] Künftige Forschungen werden erweisen, ob geringe Änderungen der isoTOP-ABPP-Quoti-

enten herangezogen werden können, um subtile Aktivitätsunterschiede quantitativ zu erfassen.

Eingegangen am 7. Februar 2011
Online veröffentlicht am 17. Mai 2011

-
- [1] S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 994.
 - [2] D. Chelius, P. V. Bondarenko, *J. Proteome Res.* **2002**, *1*, 317.
 - [3] D. A. Jeffery, M. Bogyo, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 87.
 - [4] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10018.
 - [5] D. Greenbaum, A. Baruch, L. Hayrapetian, Z. Darula, A. Burlingame, K. F. Medzihradzky, M. Bogyo, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 60.
 - [6] U. Hillaert, M. Verdoes, B. I. Florea, A. Saragliadis, K. L. L. Habets, J. Kuiper, S. Van Calenbergh, F. Ossendorp, G. A. van der Marel, C. Driessen, H. S. Overkleeft, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2477; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2442.
 - [7] C. T. Lewis, J. M. Seyer, G. M. Carlson, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 27.
 - [8] E. Weerapana, C. Wang, G. M. Simon, F. Richter, S. Khare, M. B. D. Dillon, D. A. Bachovchin, K. Mowen, D. Baker, B. F. Cravatt, *Nature* **2010**, *468*, 790.
 - [9] Z. Zhang, I. R. Ollmann, X.-S. Ye, R. Wischnat, T. Baasov, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 734.
 - [10] A.-M. Lennon-Duménil, A. H. Bakker, R. Maehr, E. Fiebiger, H. S. Overkleeft, M. Rosemblatt, H. L. Ploegh, C. C. Lagardière-Gesbert, *J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 529.
-