

Analyse von Sekundärstrukturen in Peptiden mithilfe photoaktivierbarer Aminosäureanaloga**

Knut Kölbel,* Christian H. Ihling und Andrea Sinz*

Di- und trifunktionelle Diazirine wurden und werden in Studien von Protein-Ligand- und Protein-Membran-Interaktionen intensiv genutzt^[1] (siehe auch Lit. [2]). Vor kurzem wurden die Diazirin-haltigen Aminosäureanaloga Photo-Leucin (Tabelle S1, Hintergrundinformationen) und Photo-Methionin *in vivo* in Proteine inkorporiert, um mittels Quervernetzung Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen zu detektieren.^[3] Nachfolgende Studien, für die Photo-Aminosäuren in Peptide oder Proteine eingebaut wurden, konzentrierten sich lediglich auf die Detektion intermolekularer Interaktionen.^[4] Weitergehende Informationen, z. B. niederaufgelöste Strukturen von Proteinen und Proteinkomplexen, können durch hochauflösende Massenspektrometrie (MS und MS/MS) gewonnen werden.^[5] Für die vorliegende Studie wurden erstmals die Methoden der photochemischen Quervernetzung mit einer hochgenauen massenspektrometrischen Analyse der Reaktionsprodukte kombiniert, um Turn-Strukturen in Diazirin-markierten Peptiden zu untersuchen.

Ausgehend von Bestrahlungsexperimenten mit verschiedenen substituierten Diazirinen und Lösungsmitteln wurden diradikalische und zwitterionische angeregte Zustände postuliert, die wiederum in vergleichsweise inerte lineare Diazo-Isomere oder in reaktive Carbene übergehen.^[6,7] Letztere können bekanntermaßen intramolekulare Alkene bilden^[8] und in C-H- bzw. Heteroatom-H-Bindungen einschieben.^[6,9] Die schwache UV-A-Bestrahlung (1 J cm^{-2} , ca. 5.5 min) einer Photo-Leucin-Lösung,^[10] gefolgt von einer LC/ESI-MS-Analyse (LC/ESI = Flüssigchromatographie/Elektrospray-Ionisation) resultierte in der Detektion dreier Peaks für die intakte protonierte Photo-Aminosäure sowie verschiedene Spezies mit spezifischen Masseverlusten (Abbildung 1 a). Die jeweiligen Masse-Ladungs-Verhältnisse (*m/z*) deuten auf eine Insertion in ein Wassermolekül (-10 amu) und eine intramolekulare Eliminierungsreaktion (-28 amu) hin, die zur Bildung eines Alkohols bzw. eines Alkens führen. Es wurde außerdem beobachtet, dass die Bestrahlung von Photo-Leucin auch zur Insertion in Methanol ($+4 \text{ amu}$) und Phosphorsäure ($+70 \text{ amu}$), zumindest nach Inkorporation in

Peptide (Tabelle S1). Der bei *m/z* 144.0744 könnte sowohl das Diazirin-Edukt als auch das lineare Diazo-Isomer repräsentieren, die isobar und daher mittels MS nicht unterscheidbar sind. Bei längerer UV-A-Bestrahlung verkleinerte sich dieser Peak bei gleichzeitig ansteigenden Alkohol- und Alken-Peaks.

Die relativen chromatographischen Peakflächen aller dreier Spezies wurden gegen die eingesetzte UV-A-Dosis aufgetragen (Abbildung 1 b). Die UV-A-Dosis entspricht in guter Näherung der Zeitachse, was wiederum eine kinetische Auswertung ermöglicht. Alle Spezies folgten einer apparenen Kinetik erster Ordnung mit jeweils fast identischen Geschwindigkeitskonstanten ($8.0-8.6 \times 10^{-7} \text{ % J}^{-1} \text{ cm}^2$). Offensichtlich limitierte das Verschwinden der Spezies bei *m/z* 144.0744 die Produktbildung kinetisch, was gegen die Anwesenheit des inerten Diazo-Isomers spricht.

Die UV-A-Bestrahlung von Photo-Methionin führte zu denselben Produkten wie für Photo-Leucin, wenn auch mit anderen relativen Ausbeuten und leicht höheren Geschwindigkeitskonstanten ($1.6-1.7 \times 10^{-6} \text{ % J}^{-1} \text{ cm}^2$, Abbildung 1 c). Die Alkene eluierten als fünf getrennte Peaks, wahrscheinlich aufgrund verschiedener Isomerisierungs- und Assoziationszustände (Abbildung S1). Dabei ist wesentlich, dass Alkene und Alkohole beider Photo-Aminosäuren ausschließlich in bestrahlten Proben auftraten und immer als eigenständige Peaks eluierten. Eine Photoreaktion während der HPLC-Analyse oder des ESI-Prozesses kann daher ausgeschlossen werden. Allerdings hatte die bloße Anwesenheit der Alkene bedeutende Auswirkungen auf die nachfolgende MS-Analyse markierter Peptide: Da sowohl Eliminierung als auch Quervernetzung zu identischen konstanten Neutralverlusten (-28 amu) führen, sind Alkene und intramolekular quervernetzte Peptide anhand ihrer Masse nicht unterscheidbar. Daher wurde ein Proteolyseschritt eingeführt, um zwei neue Termini zu bilden, was eine eindeutige Identifizierung durch MS/MS-Analyse ermöglichte.

Das erste hier vorgestellte Peptid wurde von dem Originalpeptid KKYTVSINGKKITVSI abgeleitet, das in Lösung eine stabile Haarnadelstruktur bildet.^[11] Charakteristisch für Sekundärstrukturen dieses Typs sind zwei durch einen β -Turn verbundene antiparallele β -Stränge. Die zahlreichen Wasserstoffbrücken zwischen den gegenüberliegenden Peptidbindungen führen zu einer relativ unflexiblen Struktur. Eine intrapeptidale Quervernetzung sollte daher die Photo-Aminosäure mit ihrem exakten Gegenüber in dieser Struktur verbinden. In unseren Experimenten wurde eine modifizierte Version (GLGGKKYTVSINGKKITVSIIGLLG) des Originalpeptids eingesetzt. Im Folgenden wird die modifizierte Version als Peptid H bezeichnet, das mit Photoleucin (Δ) an Position 2 modifizierte Peptid dagegen als Peptid H* (Ab-

[*] Dr. K. Kölbel, Dr. C. H. Ihling, Prof. Dr. A. Sinz
Pharmaceutical Chemistry and Bioanalytics, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie
Wolfgang-Langenbeck-Straße 4, 06108 Halle (Deutschland)
E-Mail: knut.koelbel@pharmazie.uni-halle.de
andrea.sinz@pharmazie.uni-halle.de

[**] Diese Arbeit wurde vom BMBF (ProNet-T³) (K.K.) sowie der DFG, der EU und dem Land Sachsen-Anhalt (A.S.) finanziell unterstützt.
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201205308> zu finden.

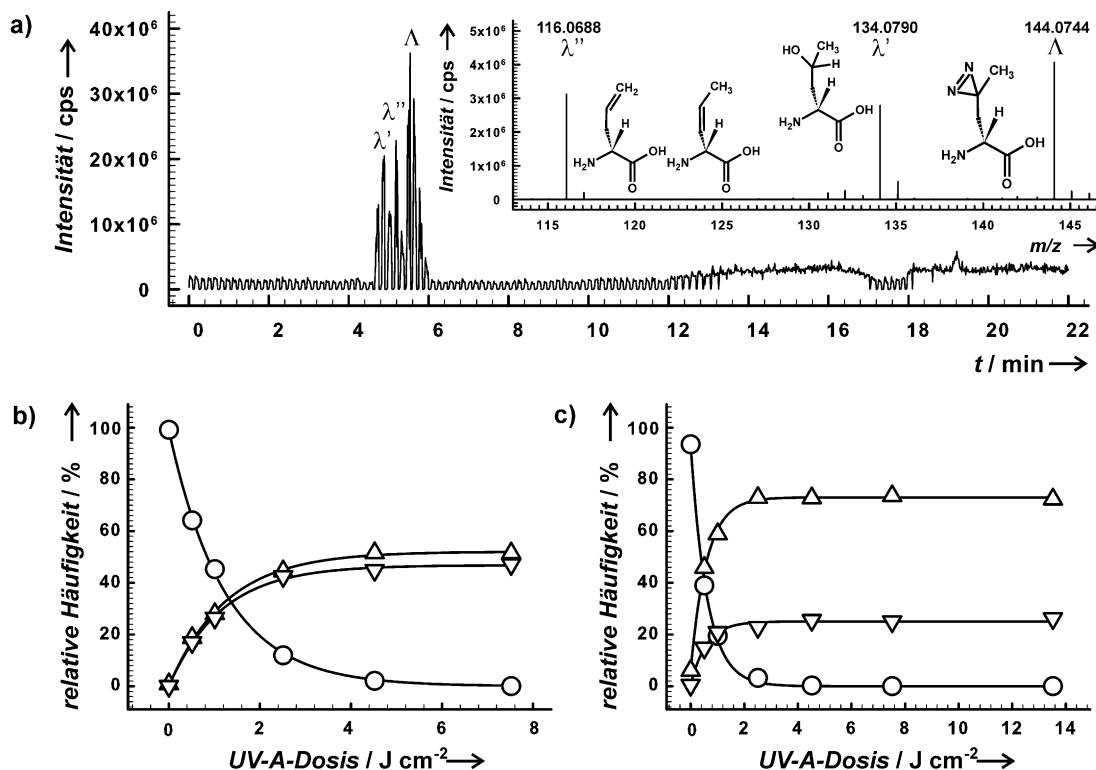


Abbildung 1. LC/ESI-MS-Analyse von Reaktionsprodukten der Photo-Aminosäuren. a) Grundlinienkorrigiertes rekonstruiertes Gesamtionenstrom-chromatogramm von UV-A-bestrahltem Photo-Leucin. Einschub: Gemittelte Ionenspektren nach Anreicherung in 4.65–5.9 min. b) Reaktionsfortschritt der Reaktion von Photo-Leucin. c) Reaktionsfortschritt der Reaktion von Photo-Methionin. Die relativen Peakflächen für intakte Photo-Aminosäuren (○) sowie Alken- (△) und Alkohol-Reaktionsprodukte (▽) wurden aus den Chromatogrammen erhalten und gegen die UV-A-Dosis aufgetragen.

bildung 2 b). Ein energiebasierter Strukturvorhersagealgorithmus [<http://www.scfbio-iitd.res.in/bhageerath/index.jsp>]^[12] lieferte fünf Strukturvorschläge. Von diesen zeigte einer in der Tat eine haarnadelähnliche Struktur mit eng beieinander lokalisierten Termini (Abbildung 2 c). Laut ihrer Fern-UV-CD-Spektren (nicht gezeigt) bilden beide Peptide (H und H*), genau wie das Originalpeptid,^[11] in Abhängigkeit von pH-Wert und Methanol Sekundärstrukturen aus.

Peptid H* wurde mit UV-A-Licht bestrahlt und mit Trypsin (schneidet C-terminal von Arg und Lys) proteolytisch gespalten. Das Gemisch wurde mittels Umkehrphasen-HPLC getrennt und online durch Nano-ESI-MS bzw. Nano-ESI-MS/MS analysiert (Abbildung 2 a und Abbildung S2). Erwartungsgemäß dominierten unmodifizierte tryptische Fragmente in den Massenspektren, während die auf eine Quervernetzung von λ^2 und Gly²⁵ zurückgehenden Signale deutlich weniger abundant waren (Abbildung S2). Die Fragmentierung von Ionen, die den quervernetzten Peptiden [1–5]–[17–25] entsprachen, führte zu geeigneten Fragmentionspektren^[13] und ermöglichte die eindeutige Identifizierung einer Quervernetzung zwischen λ^2 und Gly²⁵ (Abbildung 2 a und Abbildung S2). Darüber hinaus wurde, wenn auch mit sehr geringer Abundanz, ein Quervernetzungsprodukt aus redundanten tryptischen Fragmenten identifiziert, was die intermolekulare Quervernetzung zweier Peptide, also die Präsenz eines H*-Dimers, belegt. Dies stimmt mit der vorge-

schlagenen β -Strang-Sekundärstruktur beider „Peptidflan-ken“ überein (Abbildung S3).

Das zweite, im Folgenden mit T (GLGGPRGNGLGY-NH₂) oder T* (GAGGPRGNGLGY-NH₂) bezeichnete Peptid, enthält die Sequenz PRGN. Laut früheren Studien^[14] liegt dieses Sequenzmotiv in β -Turn-ähnlicher Konformation vor. Im Vergleich zu Haarnadelstrukturen werden solche Sekundärstrukturen deutlich weniger durch nichtkovalente Interaktionen stabilisiert. Hierzu passend weisen alle fünf durch den oben angeführten Strukturvorhersagealgorithmus vorgeschlagenen Strukturen einen Turn in der Region um Pro⁵, aber keinerlei definierte Sekundärstruktur in den N- und C-terminalen Bereichen auf (Abbildung 3). Die Fern-UV-CD-Spektren des Peptids T sind schwer zu interpretieren, wahrscheinlich aufgrund der gleichzeitigen Anwesenheit unterschiedlicher Konformationen. Zumindest einer dieser gefalteten Zustände konnte durch die Zugabe von bis zu 50% 2,2,2-Trifluorethanol (TFE) stabilisiert werden (Abbildung S4a).

Die CD-Spektren von Peptid T* waren vergleichbar (nicht gezeigt), was beweist, dass die Sekundärstruktur durch den Einbau der Photo-Aminosäure nicht verändert wird. Nach UV-A-Bestrahlung und tryptischer Spaltung des Peptids T* wurden mittels LC/ESI-MS/MS Quervernetzungen zwischen λ^2 und Leu¹⁰ bzw. Leu¹¹ sowie zwischen λ^2 und Gly¹³ bzw. Tyr¹⁴ identifiziert (Abbildung S5). Die Zugabe von 50%

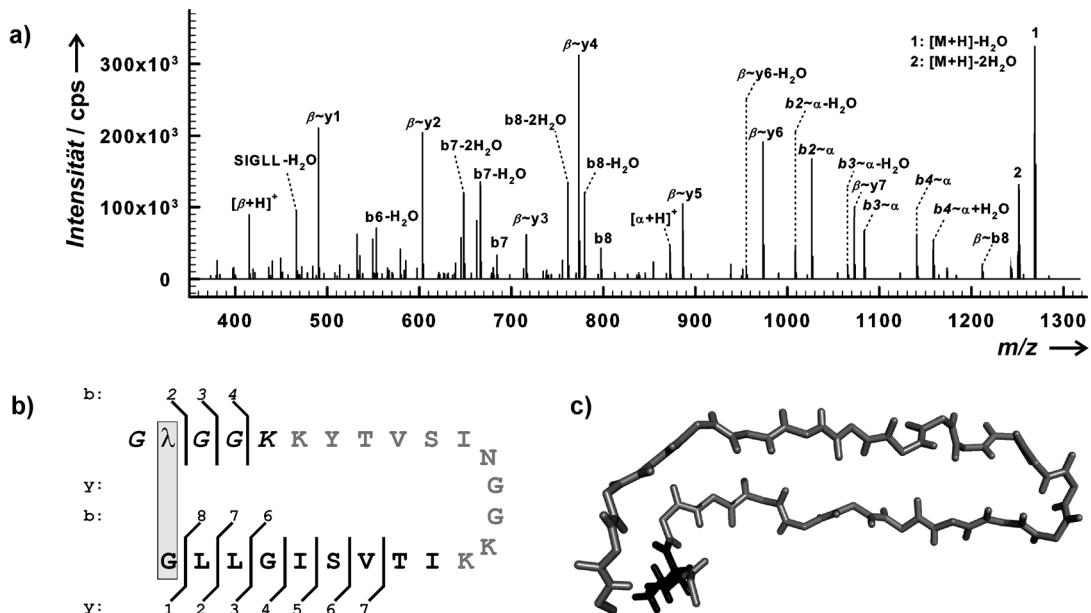


Abbildung 2. LC/ESI-MS/MS-Analyse von Peptid H^* . Eine Peptidlösung ($400 \mu\text{M}$) wurde mit UV-A-Licht bestrahlt, mit Trypsin gespalten und durch LC/ESI-MS und LC/ESI-MS/MS analysiert. a) CID-Fragmentenmassenspektrum des einfach geladenen Vorläufer-Ions der quervernetzten tryptischen Peptide [1–5]–[17–25]. b) Schematische Ansicht der identifizierten Fragment-Ionen; α - und β -Peptide (kursiv) sowie ihre Fragment-Ionen vom b- und y-Typ sind angezeigt (bezüglich der Nomenklatur siehe Lit. [13]). Der schattierte Bereich markiert die quervernetzten Aminosäurereste; Aminosäuren, die durch tryptische Spaltung entfernt wurden, sind mit grauen Buchstaben dargestellt. c) Strukturmodell von Peptid H. Das Peptid-Rückgrat ist grau, Leu² ist schwarz gezeichnet. Die Koordinaten wurden durch einen energiebasierten Strukturvorhersagealgorithmus erhalten [<http://www.scfbio-iitd.res.in/bhageerath/index.jsp>].^[12]

TFE führte zu erhöhter relativer Signalintensität der quervernetzten Produkte. Passend zu dem vorgeschlagenen Turn in der Region um Pro⁵ konnten diese Quervernetzungen eindeutig zwischen λ^2 und Leu¹⁰ bzw. λ^2 und Tyr¹⁴ zugeordnet werden (Abbildung 3a,b).

Da das Pentaprolinmotiv von Peptid P (GLGGPPPPP-GLLGY) durch seine inhärente Starre Kontakte zwischen den Peptidtermini ausschließen sollte,^[15] diente dieses als Negativkontrolle, um die Spezifität der intramolekularen Quervernetzungen in den Peptiden H^* und T^* zu bestätigen. Die Fern-UV-CD-Spektren des Peptids P, besonders in Anwesenheit von TFE, deuten auf eine Polyprolin-II-ähnliche Konformation hin (Abbildung S4b). Hiermit übereinstimmend konnten nach UV-A-Bestrahlung, Pepsinspaltung und LC/ESI-MS- bzw. LC/ESI-MS/MS-Analyse des Peptids P^* (GAGGPPPPPGLGY) keinerlei intrapeptidale Quervernetzungsprodukte identifiziert werden. Diese werden somit nicht zufällig gebildet. Vielmehr ist ihre Bildung strikt von Turn-Konformationen abhängig, die die Photo-Aminosäure in enge räumliche Nähe zur vernetzten Aminosäure bringt.

Zusammengefasst dienten Diazirin-markierte Analoga von Leucin und Methionin zur Untersuchung der durch Photoaktivierung ausgelösten Reaktionen dieser Aminosäuren. Eliminierungsreaktionsprodukte, Addukte mit Lösungsmittelkomponenten sowie Quervernetzungsprodukte der Diazirine, sowohl mit polaren als auch mit unpolaren Gruppen, wurden identifiziert. Der Einbau des Diazirinrings in Peptide führte zu keinen messbaren Strukturänderungen. Die vergleichsweise langsame Photoaktivierung bildet den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, nicht die Querver-

netzungsreaktion selbst. Diese grundlegenden Ergebnisse belegen die Eignung von in Proteine oder Peptide eingebauten Photo-Aminosäuren zur spezifischen Fixierung sowohl stabiler als auch transienter räumlich enger Kontakte. In Kombination mit einer MS-Analyse liegen somit die Voraussetzungen für weitere Peptid- und Proteinkonformationsstudien wie auch zur Beobachtung verschiedenster Protein-Ligand-Interaktionen vor. Aufgrund der starken Verbreitung von Leucin in vielen Proteinen kann von einer hohen Zahl an Quervernetzungsprodukten ausgegangen werden. Die inhärente Empfindlichkeit moderner Massenspektrometer wird die Detektion gering vorkommender Spezies unterhalb der Nachweisgrenze konventioneller Methoden wie NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallographie erlauben.

Experimentelles

Photo-Leucin, Photo-Methionin, die Peptide H , H^* , T , T^* , P und P^* ($> 95\%$ Reinheit) wurden von ThermoFisher Scientific erworben, hochreines Methanol ($> 99.9\%$) und TFE ($> 99\%$) jeweils von VWR und Sigma. Für HPLC-Lösungsmittel und Puffer wurde entionisiertes Wasser verwendet. Photo-Leucin und Photo-Methionin wurden in 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.5) gelöst (Endkonzentrationen je 26 und 8 mM). Die eiskühlten Lösungen wurden in ein selbstgebautes, mit UV-A/B-Filter und Photozelle ausgestattetes Bestrahlungsgerät^[16] platziert. Nach der Verabreichung der gewünschten UV-A-Dosen wurden Proben genommen und mithilfe eines analytischen HPLC-Systems getrennt und mittels ESI-MS (Agilent 1200 gekoppelt an ein ESI-LTQ-Orbitrap XL-Massenspektrometer von ThermoFisher Scientific) analysiert. Die Peptide H^* und T^* wurden in 100 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.5) gelöst, Peptid P^* in Wasser. Die

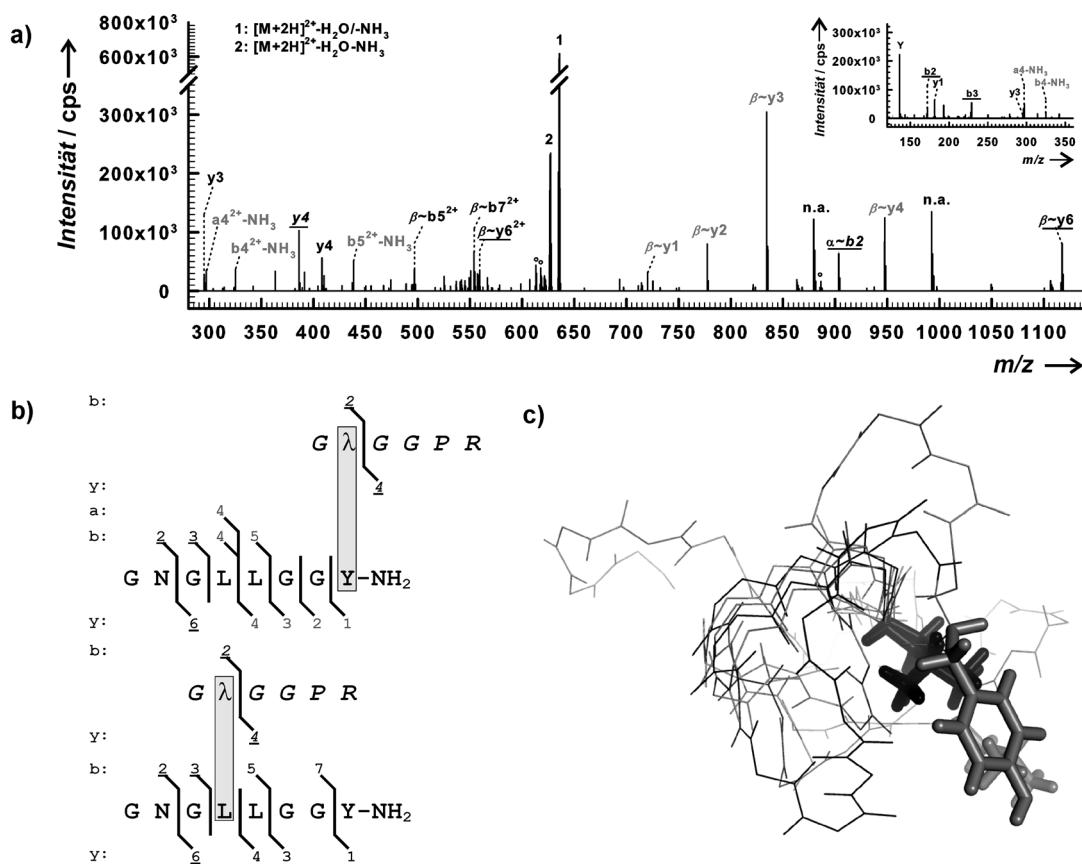


Abbildung 3. LC/ESI-MS/MS-Analyse von Peptid T*. Eine Peptidlösung (160 μ M) in 50% TFE wurde mit UV-A-Licht bestrahlt, tryptisch gespalten und durch LC/ESI-MS und LC/ESI-MS/MS analysiert. a) CID-Fragmentenmassenspektrum des doppelt geladenen Vorläufer-Ions der quervernetzten tryptischen Peptide [1–6]~[7–14]. Einschub: vergrößerter Bereich des HCD-Fragmentenmassenspektrums. Schwarze Ziffern und Buchstaben stehen für Fragment-Ionen des C-terminal quervernetzten Produkts, das schematisch in (b) gezeigt ist (oberer Teil); graue Ziffern stehen für die entsprechenden Fragmenten des alternativen quervernetzten Produkts (unterer Teil). Unterstrichene Ziffern und Buchstaben kennzeichnen eine mögliche Zuordnung zu beiden Spezies. b) Schematische Ansicht von identifizierten Fragment-Ionen. Kursive Ziffern und Buchstaben bezeichnen das β -Peptid und seine Fragment-Ionen (siehe auch a)), quervernetzte Aminosäuren sind durch schattierte Bereiche markiert. c) Strukturmodell von Peptid T. Die Koordinaten wurden wie oben beschrieben erhalten. Alle fünf Modelle sind in Überlagerung dargestellt. Das Peptid-Rückgrat und quervernetzte Aminosäuren (Leu¹⁰, Tyr¹⁴) sind grau, Leu² ist schwarz gezeichnet.

Konzentrationen wurden basierend auf den theoretischen Absorptionskoeffizienten photometrisch bei 280 nm bestimmt und variierten von 2.5 bis 1600 μ M. Mit Ausnahme der Strahlendosis (8 J cm^{-2}) wurden die Quervernetzungsreaktionen wie oben beschrieben durchgeführt, gefolgt von proteolytischer Spaltung mit Trypsin (Peptide H* und T*) oder Pepsin (Peptid P*), wiederum gefolgt von LC/ESI-MS- und LC/ESI-MS/MS-Analyse mithilfe eines UltiMate plus nano-HPLC-Systems (LC Packings) gekoppelt an ein LTQ-Orbitrap XL-Hybrid-Massenspektrometer (ThermoFisher Scientific) mit Nano-ESI-Quelle (Proxeon). Details der LC/MS-Methoden befinden sich in den Tabellen S2 und S3. Gegebenenfalls vorhandenes TFE wurde vor der proteolytischen Spaltung in einem Vakuum-Konzentrator entfernt. Spektren, die potentielle Quervernetzungsprodukte repräsentierten, wurden mithilfe der StavroX-Software^[17] identifiziert und durch manuelle Überprüfung verifiziert.

Eingegangen am 5. Juli 2012
Online veröffentlicht am 26. Oktober 2012

Stichwörter: Analysemethoden · Massenspektrometrie · Photoaffinitätsmarkierung · Sekundärstruktur · Zirkulardichroismus

- [1] L. B. Shih, H. Bayley, *Anal. Biochem.* **1985**, *144*, 132.
- [2] a) H. Bayley in *Chemistry of Diazirines*, Vol. 2 (Hrsg.: M. T. H. Liu), CRC, Boca Raton, **1987**; b) L. Dubinsky, B. P. Krom, M. M. Meijler, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 554; zit. Lit.
- [3] M. Suchanek, A. Radzikowska, C. Thiele, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 261.
- [4] a) A. L. MacKinnon, J. L. Garrison, R. S. Hegde, J. Taunton, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14560; b) T. Durek, J. Zhang, C. He, S. B. Kent, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5497; c) M. Vila-Perelló, M. R. Pratt, F. Tulin, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8068.
- [5] a) A. Sinz, *Mass Spectrom. Rev.* **2006**, *25*, 663; b) A. Sinz, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 3433.
- [6] J. Brunner, H. Senn, F. M. Richards, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 3313.

- [7] a) M. S. Platz, H. Huang, F. Ford, J. Toscano, *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69*, 803; b) J. Wang, G. Burdzinski, J. Kubicki, M. S. Platz, R. A. Moss, X. Fu, P. Piotrowiak, M. Myahkostupov, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16446; c) Y. Zhang, G. Burdzinski, J. Kubicki, M. S. Platz, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16134.
- [8] A. M. Mansoor, I. D. R. Stevens, *Tetrahedron Lett.* **1966**, *16*, 1733.
- [9] a) M. Platz, A. S. Admasu, S. Kwiatkowski, P. J. Crocker, N. Imai, D. S. Watt, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 337; b) P. J. Weber, A. G. Beck-Sickinger, *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 375.
- [10] Nichtaktiviertes Photo-Leucin wird fortan mit Λ bezeichnet, seine Reaktionsprodukte mit λ . Ihre Varianten werden mit verschiedenen Indizes charakterisiert (Tabelle S1). λ ohne Index bezeichnet ein Photo-Leucin, das an einer Quervernetzung zwischen zwei Aminosäuren beteiligt ist.
- [11] A. J. Maynard, G. J. Sharman, M. S. Searle, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1996.
- [12] B. Jayaram, K. Bhushan, S. R. Shenoy, P. Narang, S. Bose, P. Agrawal, D. Sahu, V. Pandey, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 6195.
- [13] Ionen, die den quervernetzten Peptiden [1–6]~[17–25] und [1–6]~[16–25] entsprechen, wurden ebenso identifiziert. In den Abbildungen wird die Nomenklatur nach B. Schilling, R. H. Row, B. W. Gibson, X. Guo, M. M. Young, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14*, 834 angewendet: das längere Peptid wird mit α , das kürzere mit β bezeichnet. Quervernetzungen werden durch \sim repräsentiert.
- [14] K. Koelbel, C. H. Ihling, U. Kuhn, I. Neundorf, S. Otto, J. Stichel, D. Robaa, A. G. Beck-Sickinger, A. Sinz, E. Wahle, *Biochemistry* **2012**, *51*, 5463.
- [15] B. Fierz, H. Satzger, C. Root, P. Gilch, W. Zinth, T. Kiehaber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2163.
- [16] S. Schaks, D. Maucher, C. H. Ihling, A. Sinz in *Biomacromolecular Mass Spectrometry*, Vol. 2, Nova Science, **2012**, S. 249.
- [17] M. Götze, J. Pettelkau, S. Schaks, K. Bosse, C. H. Ihling, F. Krauth, R. Fritzsche, U. Kühn, A. Sinz, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23*, 76.