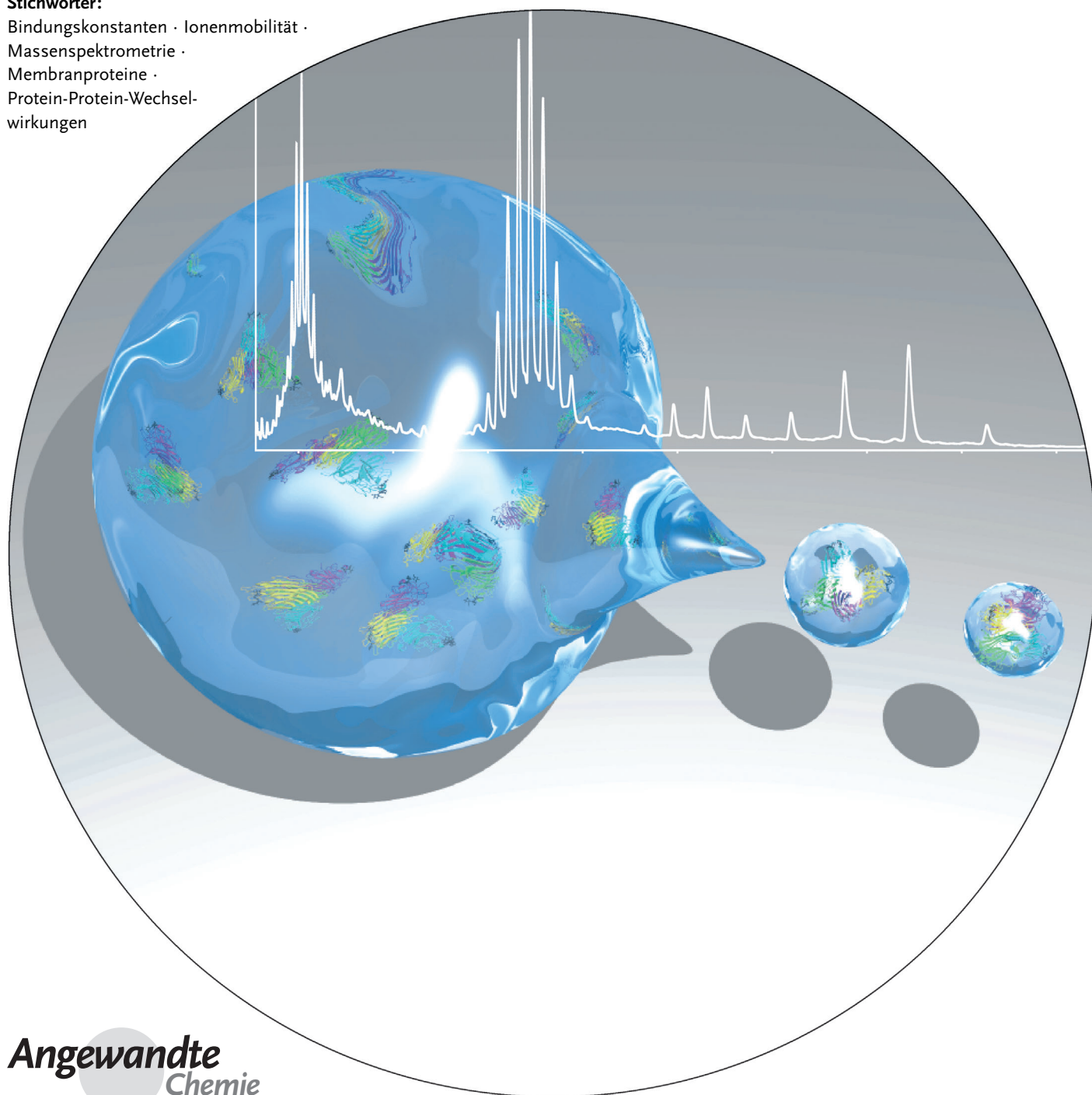


# Massenspektrometrie zur Quantifizierung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen – von molekularen Chaperonen zu Membranporinen

Jonathan T. S. Hopper und Carol V. Robinson\*

**Stichwörter:**

Bindungskonstanten · Ionenmobilität ·  
Massenspektrometrie ·  
Membranproteine ·  
Protein-Protein-Wechsel-  
wirkungen



**Die Struktur von Proteinen steht in engem Zusammenhang mit ihrer Funktion, wobei gefaltete Proteinstrukturen Erkennungsmotive zur Bindung von Liganden und anderen Proteinen darstellen. Die Massenspektrometrie (MS) kann Informationen auf verschiedenen Ebenen der Proteinstruktur zur Verfügung stellen, angefangen bei der primären Aminosäuresequenz bis hin zur dreidimensionalen Faltung und Wechselwirkungen innerhalb der Quartärstruktur. Da es sich bei der MS um ein Gasphasenverfahren handelt, scheint es vielleicht widersinnig, sie zur Untersuchung der Struktur und nichtkovalenten Wechselwirkungen von Proteinen in Lösung zu nutzen. Wir zeigen hier jedoch durch neue Einblicke in dynamische Netzwerke aus Wechselwirkungen, Dissoziationsmechanismen und die Kooperativität der Ligandenbindung, dass MS-Untersuchungen über die simple Erhaltung von Proteinwechselwirkungen in der Gasphase hinausgehen können. Wir ziehen mögliche Stolpersteine bei der Dateninterpretation in Betracht und legen einen besonderen Schwerpunkt auf jüngste Untersuchungen, die quantitative Informationen über dynamische Proteinwechselwirkungen sowohl in löslichen als auch in Membran-gebundenen Proteinanordnungen liefern.**

## 1. Einleitung

Das Verständnis des Interaktoms, des Gesamtnetzwerks von Proteinwechselwirkungen in der Zelle, ist eine anspruchsvolle Aufgabe, die zu einem wesentlichen Teil der Proteomforschung geworden ist.<sup>[1]</sup> Nicht nur ist die bloße Zahl an Wechselwirkungen nahezu unfassbar hoch – die Netzwerke sind auch noch dynamisch und ändern sich als Reaktion auf verschiedene Stimuli.<sup>[2]</sup> Außerdem sind einige Wechselwirkungen kurzlebig, was ihre Detektion, ohne dabei ihre Gleichgewichte zu stören, erschwert. Wichtig für die Beschreibung einer bestimmten Wechselwirkung ist der Erhalt quantitativer Daten für die Bindungsaffinitäten. Diese Information ermöglicht in Kombination mit zellulären Protein- und Ligandenkonzentrationen die Vorhersage des dynamischen Interaktoms und liefert die fehlende Verknüpfung zur Systembiologie.<sup>[3]</sup> Hierfür sind zuverlässige numerische Werte erforderlich, nämlich die Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ), die die Stärke der Wechselwirkung definieren. Wie Bindungsereignisse am besten überwacht und daraus die  $K_D$ -Werte für die Wechselwirkungen zwischen zwei Proteinen oder zwischen einem Protein und seinem Liganden hergeleitet werden, ist eine bedeutende Aufgabe, die bereits über 20 biophysikalische Verfahren hervorgebracht hat.<sup>[4]</sup>

Die zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten entwickelten biophysikalischen Verfahren können entweder als „trennende“ oder als „nicht-trennende“ Methoden klassifiziert werden. Die erste dieser Methoden beruht auf der Abtrennung und Quantifizierung einzelner Komponenten der Wechselwirkung mithilfe von Verfahren wie der Flüssigchromatographie<sup>[5]</sup> und der Kapillarelektrophorese.<sup>[6]</sup> Die nicht-trennenden Vorgehensweisen, z.B. kalorimetrische Verfahren, messen die Änderung einer physikalischen Eigenschaft als Reaktion auf ein Bindungsereignis. Die Be-

## Aus dem Inhalt

1. Einleitung	14225
2. Momentaufnahmen von Proteinkomplexen im Gleichgewicht	14228
3. Echtzeitverfolgung der Bildung von Proteinanordnungen	14228
4. Auswirkungen des Phasenübergangs	14229
5. Fortbestand hydrophober Wechselwirkungen in einer dehydratisierten Umgebung	14230
6. Untersuchung der Allosterie in Proteinkomplexen	14231
7. Untersuchung der Heterogenität und Dynamik in Anordnungszyklen	14231
8. Erste Anwendungen auf Membranproteine	14234
9. Zusammenfassung und Ausblick	14235

stimmung der Temperaturschwankungen, die mit einer Wechselwirkung zwischen zwei Spezies in Zusammenhang stehen, bildet die Grundlage der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC). Spektroskopische Verfahren wie die Fluoreszenzpolarisation (FA), die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) und die NMR-Spektroskopie sind nicht-trennende Methoden, und entsprechende Spektren weisen bei einem Bindungsereignis spezifische Veränderungen auf. Die Detektion des durch eine Bindung induzierten Anstiegs der Masse oder Größe bildet den vielleicht direktesten Weg zur Messung einer physikalischen Änderung ohne Trennung. Diese Eigenschaft wird von Methoden, die in Lösung arbeiten, genutzt, wie der analytischen Ultrazentrifugation (AUC) und der dynamischen Lichtstreuung (DLS).

### 1.1. Entwicklung der Massenspektrometrie für die biomolekulare Analyse

Die Massenspektrometrie zur Untersuchung von Proteinwechselwirkungen ist ein relativ neues Verfahren, was in

[\*] Dr. J. T. S. Hopper, Prof. Dr. C. V. Robinson  
Physical and Theoretical Chemistry Laboratory  
University of Oxford  
South Parks Road, Oxford OX1 3QZ (Großbritannien)  
E-Mail: carol.robinson@chem.ox.ac.uk

erster Linie darauf zurückzuführen ist, dass sie bis vor wenigen Jahrzehnten auf flüchtige Moleküle mit relativ geringem Molekulargewicht beschränkt war. Die biomolekulare MS entstand aus den bahnbrechenden Entwicklungen im Bereich der weichen Ionisationsverfahren.<sup>[7]</sup> Insbesondere die Entwicklung der Elektrosprayionisation (ESI) ermöglichte es, die Schwierigkeiten bei der Erzeugung von Gasphasenionen aus nichtflüchtigen Spezies zu überwinden. Eine Nanofluss-Variante der ESI, die nanoESI (nESI), weist bemerkenswerte Vorteile bei der Analyse großer Proteinanordnungen auf, einschließlich einer höheren Empfindlichkeit, einer besseren Toleranz gegenüber Salzen und einer effizienteren Desolvatation, was die Trocknung von Gasen sowie Erhitzen zum Entfernen von Lösungsmitteln unnötig macht.<sup>[8]</sup> Die bemerkenswerteste für diesen Aufsatz relevante Eigenschaft der ESI oder nESI ist die Fähigkeit, die in Lösung vorhandenen schwachen nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen Proteinuntereinheiten und Liganden zu bewahren.<sup>[9]</sup>

Eine behutsame Überführung aus der Lösung in die Gasphase ermöglicht die intakte Projektion außerordentlich großer und komplexer Proteinanordnungen in das Massenspektrometer. Die Transmission großer  $m/z$ -Ionen wird durch Erhöhung des Drucks innerhalb des Geräts deutlich verbessert,<sup>[10]</sup> wodurch Ionen fokussiert werden und ihre überschüssige kinetische Energie durch Stöße mit verbliebenen Gasmolekülen abgeführt wird (Stoßfokussierung).<sup>[11]</sup> Durch die Verringerung der Radiofrequenzen des Quadrupolanalytors auf 300 kHz wird der zugängliche  $m/z$ -Bereich auf 32 400 erweitert.<sup>[10]</sup> Diese Modifikationen ermöglichten die Transmission intakter großer biomolekularer Anordnungen einschließlich Ribosomen,<sup>[12]</sup> Proteasomen<sup>[13]</sup> und Viruskapsiden von etwa 18 MDa<sup>[14]</sup> im Massenspektrometer. Theoretisch kann demzufolge mithilfe der Massenspektrometrie die Bildung nichtkovalenter Wechselwirkungen in einer großen Auswahl an makromolekularen Anordnungen verfolgt werden, angefangen bei einzelnen Liganden bis hin zu makromolekularen Anordnungen in der Größenordnung von mehreren MDa.<sup>[15]</sup>

Obwohl die Detektion der Proteinanordnungen in der Gasphase erfolgt, ermöglicht dieser Prozess eine Momentaufnahme des in Lösung hergestellten Bindungsgleichgewichts und dessen Detektion im Massenspektrometer. Es sind zwei verschiedene Experimente möglich: entweder die Kontrolle der Konzentrationen der Bindungspartner oder die Begrenzung ihrer Wechselwirkungszeit. Die Bindungsaffini-

täten werden aus Experimenten abgeleitet, in denen die Konzentration kontrolliert wird, wobei die Bindungspartner in Lösung in verschiedenen Verhältnissen inkubiert werden und nach einer konstanten Inkubationszeit das Massenspektrum aufgenommen wird, sobald sich das Gleichgewicht eingestellt hat. Kinetische Informationen werden aus zeitabhängigen Untersuchungen gewonnen, bei denen die Bindungspartner inkubiert und nach bestimmten Zeitintervallen aliquote Mengen abgeführt und massenspektrometrisch untersucht werden. Idealerweise sollten in beiden Experimenten die Konzentrationen der unterschiedlichen Protein-Ligand-Systeme den physiologisch relevanten ähneln. Angesichts der abweichenden lokalen Konzentrationen innerhalb der Zelle infolge dichter Packung vorhandener Makromoleküle (Molecular Crowding) sollten jedoch nanomolare bis hin zu millimolare Proteinkonzentrationen untersucht werden, um den vollständigen Bereich der Bindungswechselwirkungen abzudecken.

Für zeitaufgelöste Experimente kann die Erfassung kurzlebiger Wechselwirkungen durch die meisten biophysikalischen Verfahren sehr problematisch sein. Da die gebildeten Komplexe kurzlebig und nur bei geringen Konzentrationen vorhanden sind, können diese flüchtigen Erscheinungen manchmal mithilfe einer MS-Analyse abgefangen werden, da die Zeit von der Desolvatation/Ionisation bis zur Aufnahme des Spektrums typischerweise im Bereich von zehn bis einigen Hundert Millisekunden liegt. Ein solcher Zeitrahmen ermöglicht die Überwachung von Bindungsvorgängen in Echtzeit (siehe Abschnitt 3).<sup>[16]</sup> In diesem Aufsatz werden sowohl zeitaufgelöste als auch konzentrationsabhängige MS-Untersuchungen berücksichtigt (Abbildung 1).

Einer der großen Vorteile der MS bei der Untersuchung biomolekularer Wechselwirkungen ist die Empfindlichkeit. Üblicherweise sind nur Pikomolmengen eines Proteinkomplexes erforderlich, während ITC oder NMR-Spektroskopie im Allgemeinen Millimolmengen benötigen. Sogar die empfindlichste ITC-Ausstattung erfordert mindestens eine um drei Größenordnungen höhere Menge eines Proteinkomplexes als die MS. Obwohl SPR und die FA zwar hinsichtlich der Empfindlichkeit konkurrieren, können diese aber keine Wechselwirkungen zwischen unmodifizierten Protein-Liganden, die frei in Lösung vorliegen, messen. Für die SPR muss einer der beiden Bindungspartner auf einer Oberfläche immobilisiert werden. Diese Anbindung kann in einigen Fällen zum Verlust der Aktivität oder zu Aviditätseffekten führen.<sup>[17]</sup>

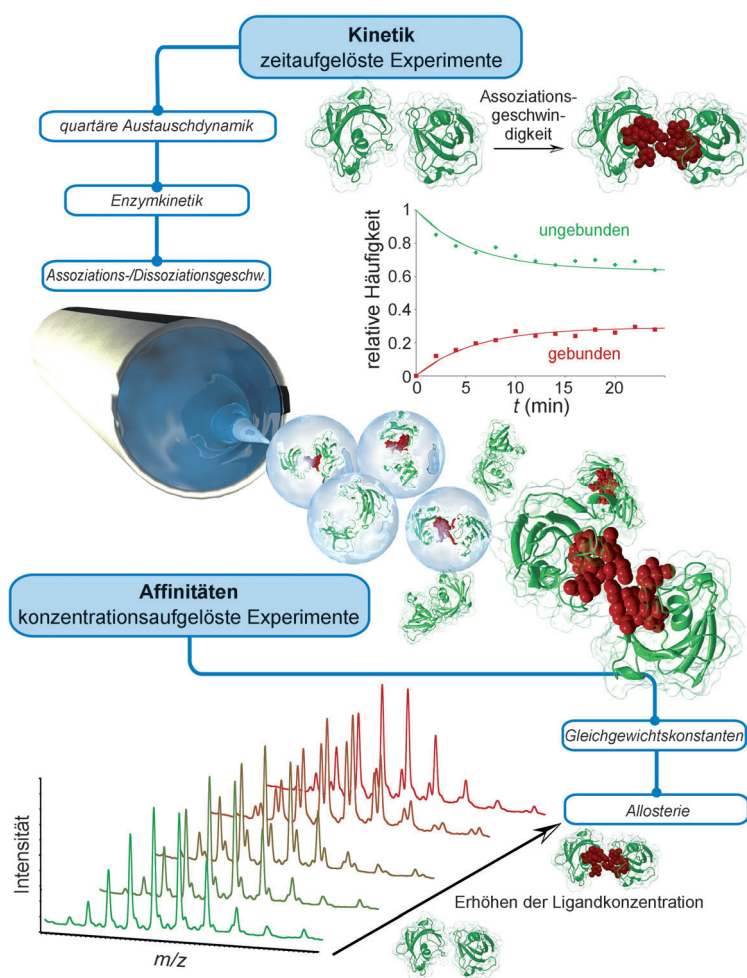


Jonathan T. S. Hopper erhielt seinen B.Sc. in Chemie von der University of Sheffield und einen M.Sc. in analytischer Chemie von der Loughborough University. Er promovierte an der University of Nottingham bei Dr. Neil Oldham auf dem Gebiet der biomolekularen Massenspektrometrie. Er wechselte an die University of Oxford zu Prof. Carol Robinson und erforscht dort die Anwendung der Massenspektrometrie auf intakte Membranproteinanordnungen.



Carol V. Robinson promovierte bei Prof. Dudley Williams an der University of Cambridge. Ihre Forschungskarriere umfasst etwa 20 Jahre und konzentrierte sich hauptsächlich auf die Bestimmung der Faltung und Bindung von Proteinen und deren Liganden. Vor kurzem wurden in ihrem Arbeitskreis neue Methoden zur Projektion von Membranproteinkomplexen in die Gasphase eines Massenspektrometers entwickelt, wo sie auf ihr Verhalten bezüglich der Bindung von Lipiden und Wirkstoffen untersucht werden können.





**Abbildung 1.** Überblick über die diskutierten experimentellen Vorgehensweisen und die daraus verfügbaren Informationen. Ein zeitaufgelöstes Experiment (obere Grafik), in dem die Bildung des gebundenen Komplexes (rot) in Abhängigkeit von der Zeit aufgenommen wird, ermöglicht die Berechnung der Assoziationsgeschwindigkeit. Bei im Gleichgewichtszustand aufgenommenen Messungen (untere Grafik) wird die Konzentration einer Komponente (in diesem Fall des Liganden) systematisch erhöht. Die Population der unterschiedlichen Spezies wird dann als Funktion der Ligandenkonzentration aufgetragen, was eine Bestimmung der Wechselwirkungsaffinität ermöglicht.

Die Voraussetzung der Fluoreszenzmarkierung einer Spezies für FA-Messungen wirft außerdem Bedenken bezüglich der Auswirkungen der Ligandenmarkierung auf die Rezeptorbindungseigenschaften auf.

Bei den meisten biophysikalischen Methoden können verschiedenste Puffer eingesetzt werden. Eine wesentliche Einschränkung des ESI-Verfahrens ist allerdings dessen Intoleranz gegenüber den in molekularbiologischen Präparationen verwendeten, nichtflüchtigen Puffersalzen. Viele Proben müssen daher vor der Analyse entsalzt werden, und es werden Puffer wie Ammoniumacetat bevorzugt, da sie während des Desolvationsprozesses einfach entfernt werden können. Der für die ESI-MS-Untersuchung zugängliche Konzentrationsbereich schränkt den mithilfe dieser Technik messbaren Affinitätsbereich ebenfalls ein, was in Abschnitt 4 detaillierter erläutert wird.

Ein weiterer Aspekt ist die Fähigkeit der MS, auf Basis des dynamischen Bereichs und der Massenauflösung, die vom Verfahren geboten werden, alle Spezies in einer Lösung gleichzeitig zu detektieren. Diese Merkmale, ebenso wie der kurze Messzeitraum, machen die MS sehr wertvoll für die Untersuchung transients Proteinwechselwirkungen, da Intermediate von Reaktionswegen oder transiente oligomere Zustände neben anderen abundanten Spezies visualisiert werden können. Dies ist von besonderer Bedeutung für komplexe, im Gleichgewicht befindliche Wechselwirkungsnetzwerke, da individuelle Spezies simultan visualisiert werden können, ohne spezifische Komplexe isolieren zu müssen, was das Gleichgewicht unvermeidbar stören würde. Die Fähigkeit zur simultanen Detektion von Komplexen ist besonders wichtig für die Untersuchung des Austauschs von Untereinheiten in Proteinkomplexen, wobei viele Produkte anhand ihrer Masse aufgelöst/getrennt werden können. Der Austausch von Untereinheiten wurde mithilfe anderer Verfahren analysiert, z.B. der Ionenaustauschchromatographie und des resonanten Fluoreszenzenergietransfers (FRET). Obwohl FRET im Unterschied zu vielen anderen Verfahren die Anwendung *in vivo* ermöglicht, erfordern beide Methoden eine Markierung der Proteinuntereinheiten und weisen somit ähnliche wie zuvor für die SPR und die FA diskutierte Nachteile auf. Im Falle von MS-Experimenten werden durch die Möglichkeit zur Verwendung isotonenmarkierter (z.B.  $^{15}\text{N}$ -markierter) Proteine die möglicherweise nachteiligen Wirkungen eines Markers vermieden.

Die MS-Methode zeichnet sich auch dadurch aus, dass sie Informationen über die Faltung eines Proteins oder Komplexes bei einem Bindungsereignis liefert. Diese Informationen sind in der Ladungszustandsserie enthalten, die eine direkte Beziehung zwischen der für die Protonierung verfügbaren Oberfläche und den in einem Massenspektrum beobachteten Ladungszuständen darstellt.<sup>[18]</sup> Da Verringerungen der Oberfläche durch die Bildung von Proteininteraktionen, oder durch Falten, herbeigeführt werden können, kann ein Hinweis auf eine Konformationsänderung durch Ligandbindung erhalten werden.

In diesem Aufsatz präsentieren wir jüngste Highlights, die die Möglichkeit der MS zur Detektion von Proteinwechselwirkungen in Lösung nutzen. In allen Beispielen profitieren diese Studien von der Fähigkeit, die Affinität von Proteinwechselwirkungen im Gleichgewicht zu quantifizieren und den kinetischen Austausch in Multiproteinanordnungen zu untersuchen. Wir erörtern außerdem Anwendungen zur Kontrolle enzymatischer Reaktionen sowie zur Aufklärung der allosterischen Kommunikation mehrerer Liganden, die an unterschiedlichen Schnittstellen eines Proteinkomplexes wechselwirken.

## 2. Momentaufnahmen von Proteinkomplexen im Gleichgewicht

Eine Lösung, die ein Protein und dessen Liganden enthält, ermöglicht bei der Überführung in ein Massenspektrometer die Aufnahme eines „Schnappschusses“ der zu einem bestimmten Zeitpunkt in Lösung gebildeten Wechselwirkungen. Massenspektren von Lösungen im Gleichgewichtszustand eröffnen den direkten Zugang zu den Dissoziationskonstanten einer Wechselwirkung, indem die Intensitäten der Peaks des Protein-Ligand-Komplexes im Verhältnis zu denjenigen des Apoproteins bestimmt werden. Die Kenntnis der Anfangskonzentrationen der einzelnen Lösungen ist entscheidend für die Berechnung der Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ). Üblicherweise werden Experimente über einen Bereich von Protein- oder Ligandenkonzentrationen hinweg durchgeführt und anhand einer von zwei mathematischen Methoden analysiert. Die erste berechnet die Assoziationskonstante für jede Konzentration und mittelt diese Werte;<sup>[19]</sup> die zweite führt eine Anpassung an die Daten mithilfe einer nichtlinearen Funktion durch.<sup>[20]</sup> Beide Vorgehensweisen wurden zur Untersuchung von Proteinwechselwirkungen mit Fettsäuren<sup>[21]</sup> und Kohlenhydraten angewendet.<sup>[22]</sup>

Ein besonders eindrucksvolles Beispiel zur Bestimmung der Bindungsaffinität wurde vor kurzem für Noroviren beschrieben, eine Gruppe viraler Pathogene, die für eine akute Gastroenteritis verantwortlich ist und die menschlichen Histo-Blutgruppenantigene (HBGA) erkennt.<sup>[23]</sup> Der C-terminale Protrusionsbereich (P) des wichtigsten Kapsidproteins bildet die Außenseite des Kapsids und ist für die Wechselwirkung mit den HBGAs verantwortlich. Die Affinitäten von 41 HBGAs für Dimere des P-Proteins wurden quantifiziert und liegen bei 400–3000 M<sup>-1</sup>. Diese Messungen ermöglichten somit eine Korrelation zwischen dem Kettentyp und der Affinität.<sup>[24]</sup>

Variationen der zeitaufgelösten und der konzentrationsabhängigen Experimente erweiterten die Anwendungen der MS auf immer komplexere Systeme, in denen die Liganden nur schwer aufzulösen sind. Da große Proteinkomplexe im Massenspektrometer üblicherweise weniger effizient desolvatisieren, was zu breiteren Peaks führt,<sup>[12]</sup> bleibt das Binden niedermolekularer Liganden oftmals unbemerkt. Unter Verwendung eines „Stellvertreterproteins“ (proxy protein, P<sub>proxy</sub>) geringen Molekulargewichts, das spezifisch mit dem Liganden von Interesse interagiert, ist es möglich, das Ausmaß der Bindung von Liganden an große Anordnungen quantitativ zu bestimmen. Diese Vorgehensweise wurde genutzt, um die Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Oligosacchariden und dem homotrimeren Tailspike-Protein der Bakteriophage P22 zu bestimmen.<sup>[25]</sup> Ein einkettiger Antikörper mit einer Masse von 27 kDa wirkte als P<sub>proxy</sub> und band an Liganden mit vorab bestimmten Affinitäten. Der Anteil des P<sub>proxy</sub>:Ligand-Komplexes reagiert in Echtzeit auf Änderungen der Ligandenkonzentration und kann daher Rückmeldung über den Ligandenanteil geben, der an das Tailspike-Protein gebunden ist. Die mithilfe der MS bestimmten Affinitäten bestätigten die  $K_a$ -Werte, die zuvor durch einen Fluoreszenzlösungs-Assay bestimmt wurden.

Eine alternative Strategie zur Lösung des Problems der nichtaufgelösten Ligandenbindung in größeren Komplexen wird als „Catch-and-Release“ bezeichnet. Wie der Name andeutet, werden dabei Liganden aus Proteinkomplexen freigesetzt. Dieses Verfahren wird in der Gasphase mithilfe der kollisionsinduzierten Dissoziation (CID) durchgeführt. Die Masse des in diesem Schritt freigesetzten Liganden kann bestimmt und zur Bestätigung seiner Identität weiter fragmentiert werden. Eine kürzlich veröffentlichte Studie erkundete Potenzial dieses Verfahrens, indem Zielproteine in Form eines einzelkettigen Antikörpers, eines Antigen-bindenden Fragments oder eines Fragments eines bakteriellen Toxins zusammen mit einer Bibliothek aus potenziellen Kohlenhydrat-Bindungspartnern inkubiert wurden.<sup>[26]</sup> Eine Bibliothek aus mehr als 200 Kohlenhydraten wurde mit mehreren Zielproteinen durchmustert, wobei Liganden, die mit Affinitäten im Bereich von 10<sup>3</sup> bis 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> binden, identifiziert wurden.

Eine interessante Entwicklung dieser Catch-and-Release-Methode ist ihre Kombination mit der Ionenmobilitäts(IM)-Spektroskopie, einem elektrophoretischen Gasphasenverfahren, das eine Trennung auf Basis der Driftgeschwindigkeit durch ein Puffergas ermöglicht und daher von der Ladung, Größe und Form abhängt.<sup>[27]</sup> Durch die Kombination beider Methoden konnten von monoklonalen Antikörperfragmenten freigesetzte Strukturisomere von Kohlenhydratliganden bestimmt werden.<sup>[28]</sup> Bibliotheken aus Kohlenhydraten wurden ebenfalls einem Screening mithilfe der Catch-and-Release-Methode unterzogen, um Wechselwirkungen mit VA387-Noroviruspartikeln zu ermitteln.<sup>[22a]</sup> Es wurden Wechselwirkungen mit allen menschlichen Histo-Blutgruppenantigenen (HBGAs), die zuvor als Norovirus-Rezeptoren ausgewiesen worden waren, detektiert, zusammen mit mehreren neuen Wechselwirkungen mit Oligosacchariden, die in den Zellwänden von Mykobakterien und in Muttermilch vorhanden sind.

## 3. Echtzeitverfolgung der Bildung von Proteinanordnungen

Der dynamische Prozess der Bildung und Auflösung eines Wechselwirkungsnetzwerkes lässt sich in Echtzeit beobachten. Experimentell erfordert dies die Bestimmung des Anteils an gebundenem Protein im Verhältnis zu ungebundenem Protein als Funktion der Zeit. Die Daten werden anschließend durch Optimierung der An/Aus-Geschwindigkeit analysiert, um die beste Anpassung an die experimentellen Daten zu erreichen, was in anderen Studien detailliert beschrieben wurde.<sup>[29]</sup> Für Reaktionen, bei denen in Intervallen von Minuten oder länger gemessen wird, gelingt dies durch eine Offline-Inkubation der Proteine und Liganden sowie durch die Aufnahme der Spektren zu vorher festgelegten Zeitpunkten. Für schnelle Reaktionen, bei denen Reaktionszeiten im Bereich von Sekunden oder Millisekunden interessant sind, können Protein und Ligand über verschiedene Spritzen eingeführt werden und mithilfe eines T-Stücks binnen kurzer Zeit vor der Elektrosprayionisation gemischt werden. Bei der Anwendung auf Experimente zur Proteinfaltung ermöglicht

die Strukturinformation, die aus den Signaturen der Ladungszustände oder mithilfe von IM-MS erhalten wurde, die Erforschung von Konformationsübergängen. Frühe Anwendungen sind die Echtzeitverfolgung der Faltung von Cytochrom c<sup>[30]</sup> sowie die Entfaltung von Myoglobin.<sup>[31]</sup> Im Unterschied zu Apomyoglobin, dessen Entfaltung nichtkooperativ ist, wechselt Holomyoglobin über einen kooperativen Entfaltungsmechanismus zwischen definierten Konformationszuständen. Mithilfe dieser MS-Methode wurde ein neuartiges Intermediat, mit einem nicht gestörten Chromophor innerhalb der Häm-Bindungstasche, beobachtet. Dieses Intermediat lag allerdings teilweise entfaltet vor, was durch eine Verschiebung der Ladungsverteilung verdeutlicht wurde und interessanterweise zuvor mithilfe optischer Spektroskopie nicht detektiert worden war; dies verdeutlicht die Empfindlichkeit dieser MS-Methode.

Mithilfe ähnlicher Entfaltungsexperimente in Echtzeit wurden die Häm-Bindungszustände von Hämoglobin durch Denaturierung in Lösung mit anschließender Dialyse in wieder faltendem Puffer beobachtet.<sup>[32]</sup> Zu bestimmten Zeitpunkten der Wiederfaltung wurden Aliquots entnommen und mit MS analysiert. Infolge der Neufaltung war es den alpha- und beta-Untereinheiten möglich, die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Proteinuntereinheiten und dem Häm wieder aufzubauen. Der ermittelte Mechanismus hierfür umfasst Häm-gebundene Monomere, die zu Heterodimeren reagieren, und aus der Assoziation der Heterodimere resultiert schließlich das native tetramere Hämoglobin.

Analoge Experimente ergänzten weitere Details des katalytischen Mechanismus des Enzyms 3-Desoxy-d-manno-2-octulosonat-8-phosphat-Synthase (KDO8PS), das für die Biosynthese von Lipopolysacchariden verantwortlich ist.<sup>[33]</sup> Es wurde ein neues, an das Enzym gebundenes Reaktionsintermediat identifiziert, das wegen seiner dynamischen Beschaffenheit zuvor nicht beobachtet worden war. Der Einsatz eines kontinuierlichen Durchfluss-Systems, bei dem Proben in Zeiträumen von Millisekunden entnommen werden können, wurde vor kurzem mit der Desorptionselektrosprayionisation (DESI) kombiniert, um so eine Verfolgung mit einer zeitlichen Auflösung von nur 300 µs zu ermöglichen.<sup>[34]</sup>

#### 4. Auswirkungen des Phasenübergangs

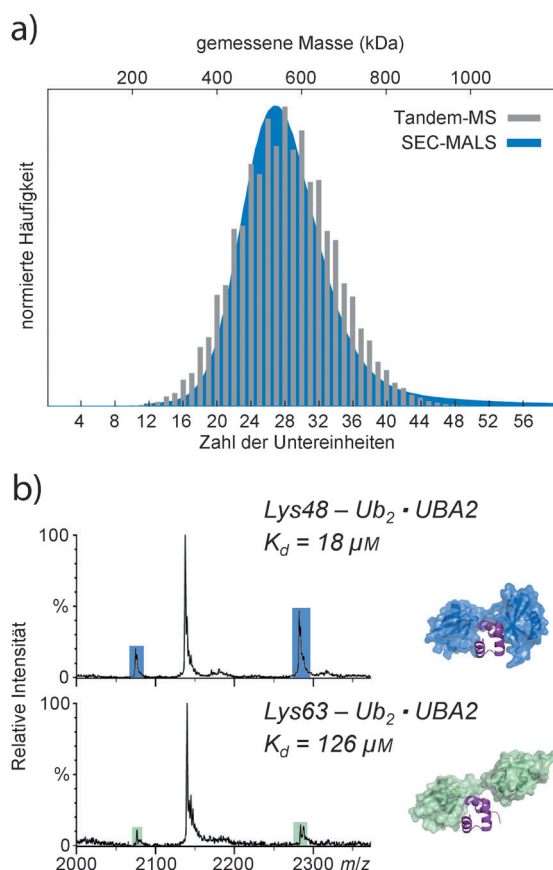
Die Verwendung der MS zur Quantifizierung der Affinität/Kinetik von Proteinwechselwirkungen gründet auf der Voraussetzung, dass Spektren das Ausmaß der Bindung in Lösung genau wiedergeben können. Um, wie in den Abschnitten 2 und 3 beschrieben, Affinitätsdaten sammeln zu können, wird das Verhältnis der sich aus gebundenem und ungebundenem Protein ergebenden Peaks als Funktion der Konzentration oder Zeit beobachtet. Allerdings gibt es Effekte, die dieses Verhältnis stören können. Besonders bedenklich ist der Desolvationsprozess, der zu drastischen Konzentrationsänderungen innerhalb der ES-Tropfen führen kann, die das Gleichgewicht beeinflussen. Dieses Problem ist bei den kleineren, während der nESI erzeugten Tropfen ge-

ringer, da die Desolvation deutlich schneller ist als die Geschwindigkeit der Bildung neuer Wechselwirkungen, die das Gleichgewicht stören könnten. Dies gilt besonders für große Liganden, insbesondere Proteine, mit entsprechend niedrigeren Diffusionskoeffizienten als kleinere Liganden.<sup>[35]</sup> Im Falle von kleinen Liganden sollte eventuell ungebundenes Material vor der vollständigen Desolvation aus den Tropfen herausgeschleudert werden, da kleine Moleküle voraussichtlich gemäß dem Ionenverdampfungsmodell ionisiert werden.<sup>[36]</sup> Klare experimentelle Belege für die Aufrechterhaltung eines dynamischen Gleichgewichts fanden sich bei der MS-Untersuchung kleiner Hitzeschockproteine, die in verschiedenen interkonvertierenden oligomeren Zuständen vorliegen. Ein direkter Vergleich zwischen der durch MS und SEC-MALS (Größenausschlusschromatographie-Mehrwinkellichtstreuung) beobachteten Oligomerverteilung demonstriert eine hervorragende Übereinstimmung zwischen Lösung und Gasphase (Abbildung 2a) und stützt die Idee, dass das Gleichgewicht während des Phasenübergangs zumindest im Falle von großen Proteinanordnungen nicht gestört wird.<sup>[37]</sup>

Im Zusammenhang mit dieser Problematik steht die Möglichkeit, dass zwei Spezies, die ursprünglich in der Volumenlösung nicht assoziiert waren, vor der Ionisation in demselben Tropfen (oder derselben Solvationshülle) eingeschlossen werden. In einem solchen Fall assoziieren die beiden Spezies nach Entfernung der letzten verbliebenen Wassermoleküle. Der Beitrag dieses Effekts ist eng mit der Konzentration der Spezies in Lösung verbunden und kann durch Arbeiten bei niedrigen Protein-/Ligandenkonzentrationen abgeschwächt werden (niedrige µM Konzentrationen). Darüber hinaus ist nicht zu erwarten, dass sich nichtspezifische, als Resultat einer raschen Desolvation aufgebaute Wechselwirkungen in der korrekten Orientierung in der korrekten Bindungstasche bilden. Die auf der Oberfläche eines Proteins gebildeten Wechselwirkungen werden einen Komplex ergeben, der deutlich schwächer als die spezifischen, im Gleichgewicht entstandenen Wechselwirkungen ist und im Anschluss an die Desolvation möglicherweise leicht dissoziiert.<sup>[35]</sup> Bei der Untersuchung von Wechselwirkungen geringer Affinität (die daher hohe Konzentrationen an Proteinen und Liganden erfordern) können zum Nachweis nichtspezifischer, im Laufe des ESI-Prozesses entstehender Wechselwirkungen statistische Verfahren angewendet werden.<sup>[38]</sup> Die wohl vielversprechendste Methode zur Ermittlung nichtspezifischer Wechselwirkungen bezieht ein Referenzprotein mit ein, das bei der Untersuchung nicht mit dem Liganden wechselwirkt.<sup>[39]</sup> Eine nichtspezifische Bindung mit dem Referenzprotein ebenso wie mit dem Zielprotein kann somit bei der Berechnung der Bindungsaffinitäten berücksichtigt werden.

Unterschiede in der Ionisationseffizienz, der Transmission und der Detektorresonanz für gebundene und ungebundene Gegenstücke können die Ergebnisse ebenfalls beeinflussen. So wurde kürzlich gezeigt, dass in derselben Lösung vorhandene Viruskapside das Ausmaß der Bindung zwischen einem variablen einzelkettigen Fragment (scFv) eines monoklonalen Antikörpers und einem Octasaccharidliganden verringern.<sup>[40]</sup> Es wird vermutet, dass der beobachtete Effekt auf





**Abbildung 2.** a) Durch MS beobachtete Oligomerverteilung (graue Balken) spiegelt genau die Verteilung in Lösung wider, die aus SEC-MALS erhalten wurde (blaue Kurve). b) Durch Ladungsreduktion optimierte ESI-MS-Bedingungen zur Erhaltung der schwachen Diubiquitin-UBA2-Wechselwirkungen. Das größere Ausmaß der Bindung im oberen Spektrum veranschaulicht die höhere Spezifität von Lys-48-verknüpftem Ubiquitin für diese Domäne gegenüber der Lys-63-Topologie im unteren Spektrum. Adaptiert aus Lit. [37,41].

einer geringeren verfügbaren Oberfläche im Elektrospray-Tropfen zurückzuführen ist. Das Protein und der Protein-Ligand(P-L)-Komplex müssen somit um die verfügbare Oberfläche konkurrieren, die wegen des vorhandenen Viruskapsids verkleinert ist. In diesem Fall verdrängt das hydrophobere freie Protein den hydrophileren P-L-Komplex von verfügbaren Oberflächenpositionen. Es wird vermutet, dass diese unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften die veränderte Ionisationseffizienz erklären (und somit das beobachtete Verhältnis).

Als allgemeine Regel wurde vorgeschlagen, dass die Bindung von Liganden, die zu einer um <10% größeren Masse im Verhältnis zu dem Protein alleine führt, keine bemerkenswerten Unterschiede in Bezug auf die Effizienz der Ionisation, Transmission und Detektion bewirkt.<sup>[19]</sup> Jüngste Anwendungen auf Protein-Protein-Komplexe, z.B. auf Wechselwirkungen zwischen Ubiquitin und der Ubiquitin-Bindungsdomäne<sup>[41]</sup> und auf den HSP90-Reaktionszyklus,<sup>[29]</sup> bei denen die Anbindung mit deutlichen Änderungen der

Masse einhergeht, verdeutlichen, dass diese <10%-Regel nicht universell anwendbar ist.

Die Dissoziation eines Proteinkomplexes im Anschluss an die nESI, jedoch vor der Detektion, ist das vielleicht grundlegendste Problem für MS-Untersuchungen von Proteinkomplexen. Sobald eine Dissoziation auftritt, wird sie eine Überschätzung des  $K_D$ -Wertes zur Folge haben. Dies galt ursprünglich besonders für Protein-Ligand-Wechselwirkungen, die stark auf den in Abschnitt 5 erläuterten, hydrophoben Wechselwirkungen beruhen.<sup>[42]</sup> Methoden, die die im Laufe der Ionisation von den Komplexen angesammelte Ladung minimieren, können eine unerwünschte Dissoziation verringern, indem sie die kinetische Energie herabsetzen und so die durch nachfolgende Stöße hinzugewonnene Energie minimieren. Die Verwendung von Imidazol,<sup>[43]</sup> die Zugabe basischer Lösungsmittel zu den Protein-haltigen Lösungen und die Einführung von Lösungsmitteldämpfen in das Quellengehäuse<sup>[44]</sup> haben die Erhaltung der schwachen intermolekularen Wechselwirkungen verbessert. Eine deutliche Verringerung der Ladung ermöglicht es, die schwachen intermolekularen Wechselwirkungen zu bewahren, z.B. zwischen Diubiquitin und Ubiquitin-bindenden Domänen (Abbildung 2b), und offenbart die Spezifität, die zwischen den unterschiedlichen Lysinverknüpfungen besteht (K48- oder K63-verknüpftes Diubiquitin).<sup>[41]</sup>

## 5. Fortbestand hydrophober Wechselwirkungen in einer dehydratisierten Umgebung

Die Auswirkungen der Überführung eines Proteinkomplexes aus der Lösung in die desolvatisierte Umgebung eines Massenspektrometers auf die Proteinstruktur werden seit den ersten Anwendungen des Verfahrens auf Biomoleküle diskutiert. Grundlegende Wechselwirkungen, die für die Proteinstruktur verantwortlich sind, werden stark von den abschirmenden Effekten des Wassers beeinflusst. Diese Wechselwirkungen umfassen Wasserstoffbrücken, elektrostatische Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräfte, die alle in Abwesenheit von Wasser zunehmen. Eine immer wieder auftretende Frage ist die nach dem Schicksal hydrophober Wechselwirkungen. Angesichts der zahlreichen Berichte über hydrophobe Membranproteinkomplexe, die im Vakuum fortbestehen, müssen die zwischen hydrophoben Kontaktstellen gebildeten Van-der-Waals-/Dispersionskräfte allerdings ausreichen, um solche Komplexe innerhalb des Massenspektrometers zu erhalten.<sup>[45]</sup>

In Anbetracht der Verbindungen, die in der Gasphase erhalten bleiben und nahezu ausschließlich auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhen,<sup>[46]</sup> beeindruckt eine Reihe von Studien, die sich auf die Wechselwirkungen zwischen Rinder- $\beta$ -Lactoglobulin und verschiedenen Fettsäuren konzentriert.<sup>[47]</sup> Die Stärken der Wechselwirkungen dieser Komplexe wurden mithilfe zeitaufgelöster, Schwarzkörperstrahlung-induzierter Dissoziation (BIRD) in der Gasphase ermittelt. Die Fettsäuren enthalten Carbonsäurefunktionen, die Wasserstoffbrücken zur Proteinkette bilden. Interessanterweise war die zur Gasphasendissoziation des Liganden erforderliche Aktivierungsenergie abhängig von der Länge der Alkylkette,

was veranschaulicht, dass diese hydrophoben Wechselwirkungen im Vakuum erhalten bleiben.<sup>[47a]</sup> Eine Serie synthetischer supramolekularer Komplexe, die ausschließlich über hydrophobe Kräfte mit  $\beta$ -Cyclodextrinen wechselwirken, wurde auf ähnliche Weise mithilfe verschiedener ESI-Varianten (einschließlich nESI, Kaltsprayionisation und Elektroschallsprayionisation) auf die Erhaltung dieser Wechselwirkungen im Massenspektrometer hin untersucht.<sup>[48]</sup> Da in diesen Komplexen keine andersartigen Wechselwirkungen möglich waren, lieferte die Studie einen eindeutigen Nachweis dafür, dass hydrophobe Wechselwirkungen in der Gasphase fortbestehen können.

Nachdem festgestellt worden war, dass hydrophobe Wechselwirkungen zwischen kleinen Proteinen das Elektrosprayverfahren und die Übertragung in die Gasphase innerhalb des Gerätes überleben können, wurden die Affinität und die Spezifität verschiedener, über hydrophobe Kräfte wechselwirkender Poly-Ub-Ketten für mehrere Ubiquitin-Bindungsdomänen (UBD) erforscht.<sup>[41]</sup> Eine Reduktion der Ladung diente dazu, Dissoziationseffekte in der Gasphase zu unterbinden (Abbildung 2b), und die Vorgehensweise wurde mithilfe zuvor charakterisierter Ub-UBD-Komplexe validiert. Wechselwirkungen mit UBDs wirken als Kontrolle für das weitere Schicksal der Polyubiquitin-verknüpften Proteine. Die Ub-assoziierte Domäne 2 (UBA2) von HR23a, die die Lieferung von Substraten an das Proteasom steuert, weist eine erhöhte Affinität für K48-verknüpfte Ketten auf, was durch MS bestätigt wurde (Abbildung 2b). Die Bindungsaffinitäten für unbekannte UBD-Ub-Wechselwirkungen wurden ebenfalls bestimmt, und die Detektion eines aus Ub und zwei verschiedenen UBDs gebildeten, ternären Komplexes lässt auf ein mögliches Zusammenspiel zwischen getrennten Signalwegen schließen.  $K_D$ -Werte von bis zu 200  $\mu\text{M}$  konnten für den schwächsten der untersuchten UBD-Ub-Komplexe bei nahezu physiologischer Konzentration (4  $\mu\text{M}$  UBD) bestimmt werden.

Abschließend ist anzumerken, dass der Zeitrahmen von MS-Messungen – d. h. die Zeit, in der Proteinkomplexe vor der Detektion im desolvatisierten Zustand vorliegen – in einer Größenordnung von einigen Millisekunden liegt. Auch wenn es unwahrscheinlich ist, dass desolvatisierte Proteinkomplexe in einer Konformation auftreten, die ein Energieminimum darstellt, ist die Zeitskala der Messungen kleiner als die der Kinetiken struktureller Umordnungen, was bedeutet, dass die Metastabilität bei ihrem Überleben ein wichtiger Faktor ist.<sup>[49]</sup>

## 6. Untersuchung der Allosterie in Proteinkomplexen

Allosterie bezieht sich auf einen Effekt, bei dem die Bindung eines Modulators an ein Protein eine Reaktion des Komplexes induziert. Diese Reaktion wird auf die ganze Proteinstruktur übertragen, um den Komplex hinsichtlich einer nachfolgenden Bindung zu aktivieren.<sup>[50]</sup> Dies kann grob vereinfacht als molekularer Schaltvorgang angesehen werden, und bei solchen Wechselwirkungen handelt es sich um gängige regulierende Kontrollen innerhalb der Zelle. Die Kooperativität einer Metallionenbindung an zahlreiche Pro-

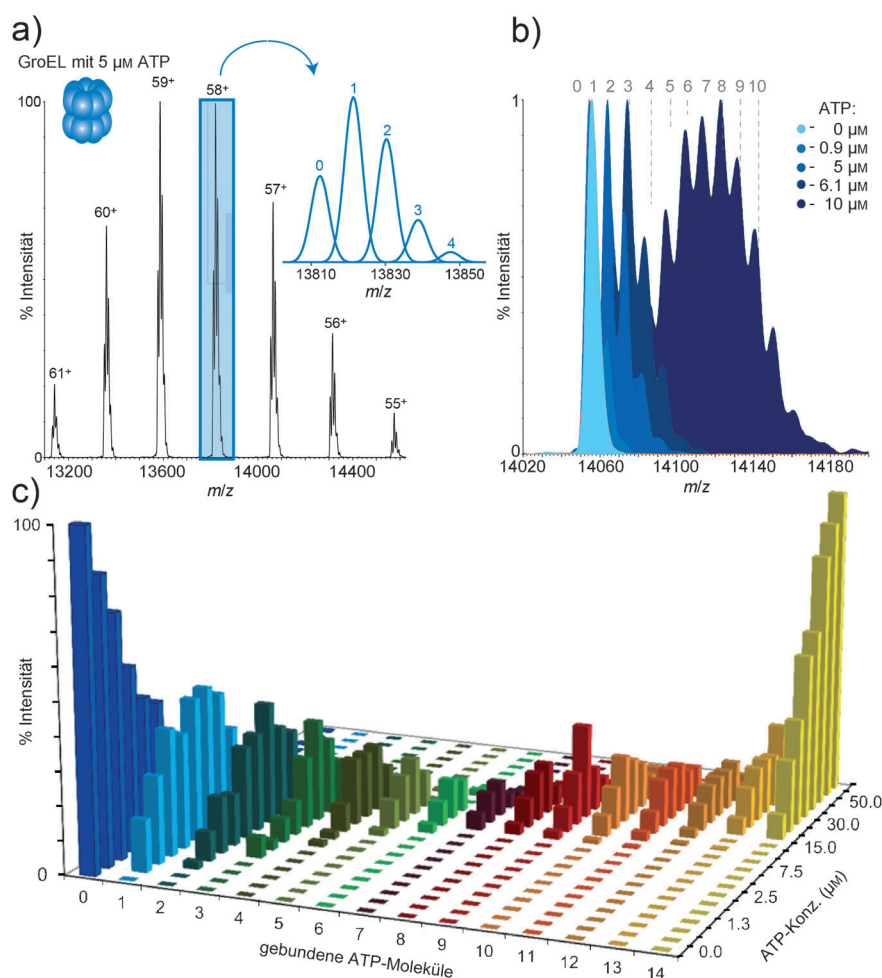
teine<sup>[51]</sup> sowie die Wechselwirkungen von an Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase gebundenen Kofaktoren<sup>[52]</sup> repräsentieren allosterische Bindungsmechanismen, die mithilfe von MS beobachtet wurden. Vor kurzem wurde das homotetramere Enzym Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), ein mögliches Zielprotein für die Diabetesbehandlung, zusammen mit verschiedenen Inhibitoren untersucht.<sup>[53]</sup> Eine eindeutige Verstärkung der sukzessiven Bindung der Inhibitoren bedeutete, dass die vier Bindungsstellen mit positiver Kooperativität wirken.

Eine beeindruckende Studie zur allosterischen Bindung befasste sich mit GroEL,<sup>[54]</sup> einem Chaperonin mit einer Masse von 800 kDa, das aus zwei gestapelten homoheptameren Ringen mit 14 ATP-Bindungsstellen besteht. Die Faltung der Zielproteine verläuft über ATP-angetriebene allosterische Bewegungen der molekularen Maschine.<sup>[55]</sup> Da die Masse von ATP nur ca. 0.06 % der Masse von GroEL beträgt, bestand ein Schlüsselfaktor für das experimentelle Design darin, die  $m/z$ -Differenz mit jeder ATP-Bindung zu vergrößern. Dies gelang durch eine Ladungsreduktion mithilfe flüchtiger, MS-kompatibler Puffer (Abbildung 3a). Ammoniumacetat wurde vermieden, da das Ammoniumion das Kaliumion bei der Förderung der ATP-Hydrolyse durch GroEL ersetzen kann, was heterogene Spektren zur Folge hat. Ethylendiammoniumdiacetat (EDDA) verhinderte eine Hydrolyse von ATP, und die begleitende Ladungsreduktion verstärkte die Trennung zwischen aufeinanderfolgenden ATP-Bindungsereignissen, was eine Messung ihrer Häufigkeit als Funktion der ATP-Konzentration ermöglichte (Abbildung 3b,c). Es wurden Hill-Koeffizienten für unterschiedliche Sättigungsgrade von Bindungsstellen berechnet, was die Kalkulation der  $K_D$ -Werte für nachfolgende Bindungsereignisse ermöglichte. Die Daten liefern einen klaren Beleg für allosterische Kommunikation, die auf sukzessive Bindungsereignisse folgt.

## 7. Untersuchung der Heterogenität und Dynamik in Anordnungszyklen

Die Hitzeschockproteine sind unter zellulären Stressbedingungen hochreguliert, wobei HSP90 zu den abundantesten gehört (1–2 % der Gesamtproteinmasse).<sup>[56]</sup> Die funktionale Aktivität dieses Komplexes ist das Ergebnis einer hoch dynamischen und kooperativen Anordnung unter Einbezug verschiedener Cochaperone. Die resultierende heterogene Beschaffenheit der entstehenden Komplexe ist für andere biophysikalische Verfahren eine Herausforderung, wurde aber vor kurzem mittels MS untersucht.<sup>[29]</sup> Die aufgenommenen Spektren waren mit konventioneller Software schwer zu interpretieren, da zahlreiche Wechselwirkungen simultan auftraten, was viele überlappende Komplexe zur Folge hatte, die mit eigens entwickelter Software aufgeschlüsselt werden mussten (Abbildung 4a).<sup>[57]</sup> Experimente zur Anordnung in Echtzeit ermöglichten die simultane Beobachtung der Bildung und Dissoziation zahlreicher Komplexe (Abbildung 4b). Es gelang, mithilfe mehrerer Spektren 14  $K_D$ -Werte für die durch MS beobachteten Gleichgewichte zu berechnen. Die Daten deckten außerdem die Spezifität bei





**Abbildung 3.** a) Ladungsreduzierte Spektren des GroEL-Komplexes zur Auflösung/Trennung der Bindung mehrerer ATP-Moleküle in (b). c) Die Population jeder Bindung als Funktion der Konzentration liefert ein Maß für die Affinität, die in diesem Fall die allosterische Kommunikation innerhalb des Komplexes offenbart. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [54].

der Komplexbildung auf und sind zusammen mit den  $K_D$ -Werten in Abbildung 4c zusammengefasst. Die Kombination der  $K_D$ -Werte mit den zellulären Konzentrationen der einzelnen Komponenten ermöglichte es, die innerhalb der Zelle gebildeten Komplexe zu definieren.

### 7.1. Quartäre Austauschdynamik in Proteinanordnungen

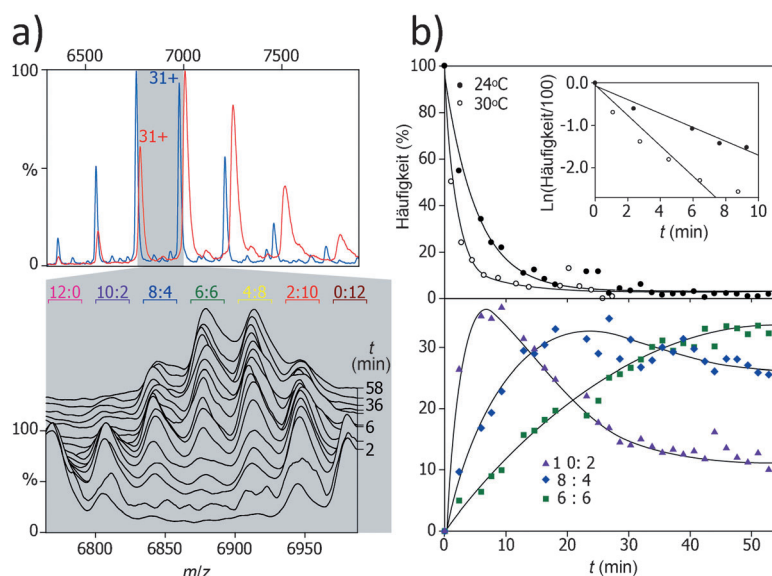
Im Gleichgewicht liegen einige Proteinkomplexe als polydisperse Anordnungen vor, die verschiedene oligomere Zustände einnehmen, die oft von Änderungen ihrer Umgebung beeinflusst werden und anspruchsvolle Systeme für die Untersuchung durch konventionelle strukturelle biologische Methoden darstellen. Die Entstehung solcher dynamischer Anordnungen kann nur verstanden werden, indem ermittelt wird, wie dieses Verhalten ihre Funktion beeinflusst. Traditionelle Verfahren, bei denen die Daten repräsentativ für ein durchschnittliches Verhalten in Lösung sind, eignen sich nicht zur Untersuchung des Verhaltens eines bestimmten oligomeren Zustands. Wie in Abschnitt 7 veranschaulicht, kann ein

Echtzeitanalyse genutzt werden, um die quartäre Dynamik polydisperser Systeme im Gleichgewicht unter definierten Umgebungsbedingungen zu verfolgen. Experimente zum Austausch von Untereinheiten beruhen auf Massenunterschieden der Untereinheiten, um ihren Einbau in eine Proteinanordnung zu verfolgen. Der Einbau von beispielsweise einer verkürzten Version des Proteins verdeutlicht die Auswirkungen bestimmter Reste in quartären Dynamiken. Alternativ können homooligomere Komplexe untersucht werden, indem der Einbau markierter Untereinheiten verfolgt wird ( $^{13}\text{C}$  und/oder  $^{15}\text{N}$ ). Diese Methoden wurden zur Charakterisierung der Dynamik der Untereinheiten in IgG-Antikörpern,<sup>[58]</sup> HBV-Kapsiden<sup>[59]</sup> und Proteinkäfigen<sup>[60]</sup> angewendet.

Kleine Hitzeschockproteine (sHSPs) liegen in verschiedenen interkonvertierenden oligomeren Zuständen vor;<sup>[61]</sup> ihre Hauptaufgabe besteht in der Wechselwirkung mit fehlgefalteten Proteinen zur Verhinderung von Aggregation.<sup>[62]</sup> Eine Fehlfunktion dieser Proteine spielt bei zahlreichen Krankheiten eine Rolle.<sup>[63]</sup> Von besonderem Interesse sind  $\alpha$ -Kristalline – Säugetier-sHSPs, die in außerordentlicher Menge in den Augenlinsen vorkommen.<sup>[64]</sup> Sie besetzen mehrere interkonvertierende oligomere Zustände mit Molmassen im Bereich von 300 kDa bis über 1 MDa.

In frühen Experimenten zum Austausch von Untereinheiten in  $\alpha$ A-Kristallin wurde der Beitrag fünf C-terminaler Reste erforscht, indem das Protein verkürzt und sein Verhalten mit dem des Wildtyp-Proteins verglichen wurde.<sup>[65]</sup> Durch die Verkürzung wird die Größe der von der Anordnung gebildeten Oligomere verringert.  $\alpha$ B-Kristallin, bei dem es sich ebenfalls um einen Bestandteil der  $\alpha$ -Kristallin-Anordnungen im Auge handelt, wurde in Gegenwart von  $\alpha$ A-Kristallin untersucht. Im Unterschied zu anderen sHSPs tauschen die Säugetier-Komplexe monomere Untereinheiten aus, was darauf schließen lässt, dass die Polydispersität von  $\alpha$ B-Kristallin anhand der Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen den Monomeren innerhalb der dimeren Bausteine der Anordnung verstanden werden kann.<sup>[16b]</sup> Um den Durchsatz dieser Untereinheiten-austausch-Experimente zu erhöhen, wurden zwei sHSPs aus *Arabidopsis thaliana* mithilfe einer automatisierten, chipbasierten nESI-Quelle untersucht.<sup>[66]</sup> Solche Experimente zeigten, dass die intradimeren Bausteine diejenigen waren, die zwischen den Oligomeren ausgetauscht wurden. Demzufolge setzten sich die wichtigsten beobachteten Oligomere aus einer geraden Zahl von Untereinheiten





**Abbildung 5.** Austausch von Untereinheiten zwischen HSP17.6 (rot) und HSP18.1 (blau) aus *Arabidopsis thaliana*. a) Die Massenspektren der beiden Proteine veranschaulichen die Fähigkeit zur Auflösung der beiden Komplexe gemäß ihrer Masse. Mit der Zeit werden die diskreten Peaks durch solche von neuen, mit verschiedenen Stöchiometrien gebildeten Spezies ersetzt, die mit einem Austausch von Dimeren zwischen den beiden Anordnungen in Einklang sind (untere Grafik). b) Exponentieller Zerfall der Homododecamere bei 30°C (weiße Kreise) und bei 24°C (schwarze Kreise). Die relative Häufigkeit der Heterododecamere 10:2 (lila Dreiecke), 8:4 (blaue Rauten) und 6:6 (grüne Quadrate) zeigt, dass der Austausch über Dimere erfolgt (untere Grafik). Adaptiert aus Lit. [66].

Oligomere erwiesen sich als dynamisch, mit einer Austauschgeschwindigkeit für die Untereinheiten, die mit wachsender Oligomergröße sank. Durch Beobachtung der Dynamik dieser frühen Oligomere, zusammen mit Strukturinformationen aus IM-Messungen, gelang den Autoren die Konstruktion eines Modells für die frühe Oligomerenanordnung dieses Proteins.

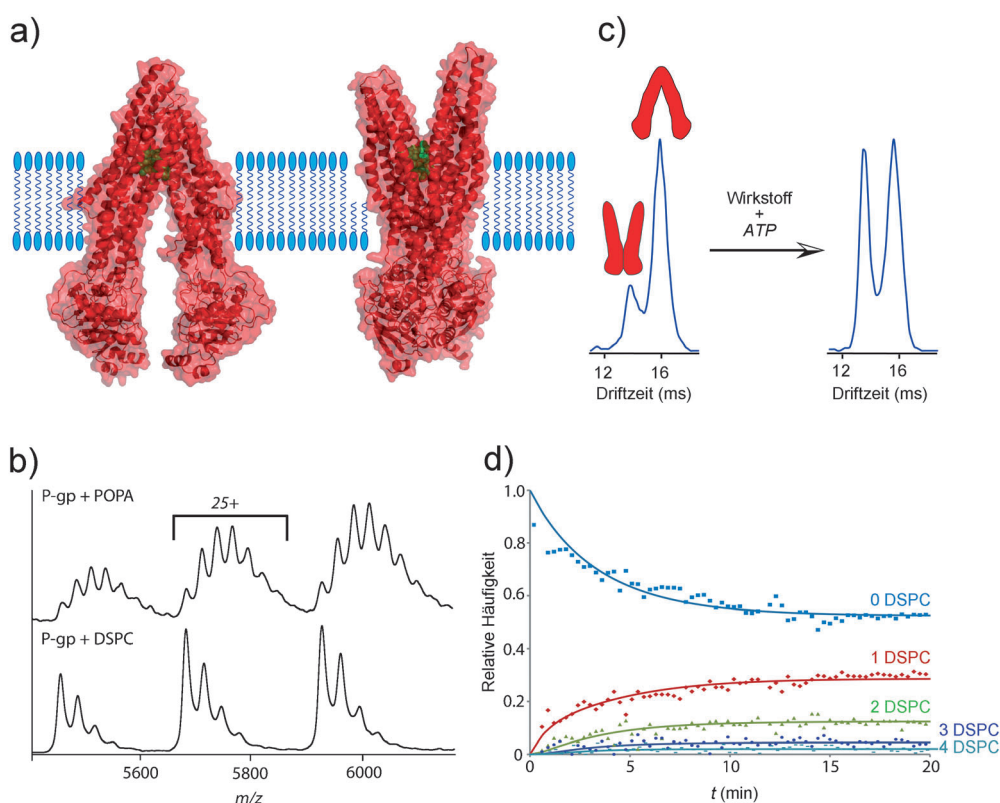
## 8. Erste Anwendungen auf Membranproteine

Die Fähigkeit, intakte Membranproteine in der Gasphase zu untersuchen, ist eine neue Entwicklung, die den Anwendungsbereich dieses Verfahrens auf einige der anspruchsvollsten Komplexe der Strukturbiologie erweitert.<sup>[73]</sup> Aufgrund ihres geringen Expressionsniveaus und wegen Löslichkeitsproblemen wurde eine zwar wachsende, aber doch relativ begrenzte Zahl von Strukturen auf atomarer Ebene aufgeklärt. Die MS-Methode beinhaltet das Einführen von Membranproteinen, die in Detergenzmicellen aus geladenen Tropfen eingekapselt sind, und die anschließende Freisetzung nackter Proteinanordnungen durch Stoßaktivierung.<sup>[73c]</sup> Protein-Protein-Wechselwirkungen, einschließlich derjenigen zwischen Transmembran-Untereinheiten, konnten aufrechterhalten werden; ob Wechselwirkungen mit kleinen Liganden konserviert werden konnten, war aber unklar. Dies war besonders schwierig angesichts der vorhandenen Detergenzmicelle, die unter Beibehaltung der Bindung kleiner Liganden entfernt werden muss.

Das integrale Membranprotein P-Glycoprotein (P-gp)<sup>[74]</sup> ist ein ATP-bindender Kassetten-Transporter (ABC-Transporter), der für die aktive Beförderung verschiedener Substrate durch die Membran zuständig ist und röntgenkristallographisch untersucht wurde.<sup>[75]</sup> Wegen seiner Funktion ist P-gp an vielen Multiresistenzen gegenüber Wirkstoffen beteiligt, indem es als Effluxpumpe wirkt, die Chemotherapeutika aus den Krebszellen entfernt.<sup>[76]</sup> P-gp enthält zwei Transmembranhelices, die beide sechs Transmembranhelices umfassen.<sup>[75,77]</sup> Diese Helices bilden eine hydrophobe Bindungstasche, in der sich das Substrat befindet. Es wird vorgeschlagen, dass eine ATP-getriebene Konformationsänderung das Substrat zur anderen Seite der Membran transferiert (Abbildung 6a).<sup>[78]</sup> Mithilfe zeitaufgelöster Messungen wurde die Intensität mehrerer Lipid-gebundener Spezies verfolgt, was die Berechnung von  $K_D$ -Werten ermöglichte (Abbildung 6c).<sup>[74]</sup> Die Ergebnisse offenbarten, dass bis zu sechs negativ geladene Lipide simultan an P-gp binden können, und zwar bevorzugter Weise als zwitterionische Lipide (Abbildung 6b). Messungen zur Ionenmobilität zufolge liegt das Protein in einem empfindlichen Gleichgewicht zwischen zwei Konformationen vor, die nach innen und nach außen gerichteten Formen zugeordnet wurden. Die Zugabe von Liganden und Lipiden scheint die kleinere, nach außen gerichtete Konformation zu stabilisieren, die für den Efflux erforderlich ist (Abbildung 6d). Frühere Studien an P-gp, die sich mit der Beobachtung der konformativen Dynamik befassen, umfassten FRET<sup>[78]</sup> und EPR-Spektroskopie.<sup>[79]</sup> Die MS-Untersuchungen wurden hingegen mit nichtmarkiertem Protein/Liganden durchgeführt und konnten simultan die durch mehrere Bindungspartner ausgelösten Konformationsänderungen verfolgen. Entgegen den Erwartungen wurde herausgefunden, dass die Bindung von Cyclosporin A (CsA) die Bindung von Cardiolipin erhöht, was vermuten lässt, dass CsA eine offene Konformation stabilisiert und anschließend den Zugang von Cardiolipin zur internen Bindungstasche verbessert.

Eine besonders anspruchsvolle Aufgabe für alle Strukturverfahren sind Proteinkomplexe, die aus löslichen Proteinen und mehreren in Membranen eingebetteten Subkomplexen bestehen. Ein Beispiel für diese Architektur sind Komplexe der Colicine, zytotoxischer Proteine, die von *E. coli* exprimiert und freigesetzt werden und die andere, eng verwandte Bakterien im Zuge interbakterieller Konkurrenz abtöten. ColicinE9 (ColE9) bindet zunächst an den Vitamin-B<sub>12</sub>-Rezeptor BtuB und rekrutiert nachfolgend das trimere Membranporin OmpF über den intrinsisch ungefalteten N-Terminus ColE9. Diese ungefaltete Domäne von ColE9 durchquert eines der drei OmpF-Proteine und fängt auf der anderen Seite das periplasmatische Protein TolB ein (Abbildung 7a, Einschub). Eine Disulfidbrücke zwischen ColE9 und TolB ermöglichte die Extraktion und Reinigung der gesamten heptameren Proteinanordnung mithilfe eines Detergenzes





**Abbildung 6.** a) Pgp ändert für einen Transmembrantransport seine Konformation. b) Die Bevorzugung negativ geladener Lipide wird durch zusätzliche Peaks demonstriert, die der Bindung von bis zu sechs POPA-Liganden entsprechen, verglichen mit maximal drei 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholinen (DSPC) bei Zugabe zu P-gp in Detergenzmicellen. c) Die IM-MS-Daten offenbaren zwei Konformationszustände, die offenen und geschlossenen Zuständen des Proteins zugeordnet wurden, deren Gleichgewicht durch die Bindung eines Wirkstoffs sowie ATP beeinflusst wird. d) Die Bindungskinetik der Lipidbindung kann durch die Aufnahme von Spektren zu bestimmten Zeitpunkten  $t$  verfolgt werden, und ein Angleichen an die Daten ermöglicht die Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeiten.

zum Schutz von Transmembran-Untereinheiten in zwei verschiedenen, in der Membran eingebetteten Positionen. Diese Anordnung wird wahrscheinlich in zwei Detergenzmicellen extrahiert, durch eine sorgfältig kontrollierte Beschleunigung zur Entfernung des Detergenzes konnte jedoch der vollständige Komplex von etwa 300 kDa in die Gasphase übertragen und so die Stöchiometrie der Anordnung bestätigt werden. (Abbildung 7a). Die Freisetzung dieses Komplexes aus zwei Micellen ist in Einklang mit den jüngsten Vorschlägen, denen zufolge die Verflüchtigung des Detergenzes eine Schutzfunktion bezüglich der Erhaltung der Proteinkomplexe in der Gasphase hat.<sup>[80]</sup>

Ein Proteolysefragment des vollständigen Translokons, das ein aktives OmpF-Trimer zurückhält, ermöglichte die Bestimmung der Wechselwirkung des OmpF-Bindungssepi-tops des Colicins (Abbildung 7b). Mithilfe konzentrations-kontrollierter Zugabe eines Peptids, das das OmpF-Bin-dungssepi-top von ColE9 repliziert, wurde ein  $K_D$ -Wert von  $1.4 \mu\text{M}$  bestimmt. Dieser Wert stimmte gut mit einer nach-folgenden ITC-Messung in demselben Puffer ( $K_D = 1 \mu\text{M}$ ; Abbildung 7b–d) überein. Diese MS-Untersuchung zeigt dementsprechend, dass zuverlässige  $K_D$ -Messungen für Membrankomplexe möglich sind, und offenbarte außerdem

durch die Stöchiometrie der Peptidbindung, dass nur eines der OmpF-Porine für eine Peptidbindung in Gegenwart von ColE9 zugänglich war. Eine Bestätigung hierfür mithilfe von Elektronenmikroskopie (EM) und durch Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit ermöglichte es, einen neuen Signalme-chanismus vorzuschlagen, nach dem das Colicin in das Periplasma eindringt und durch ein freies Porin hin-durch zurückgefädelt wird. Es wird angenommen, dass die Verankerung dieser in-trinsisch ungefalteten Domäne durch zwei Poren die entropische Benachteiligung für das periplasmisch exponierte Epitop bei der Bindung an sein TolB-Ziel verringert.

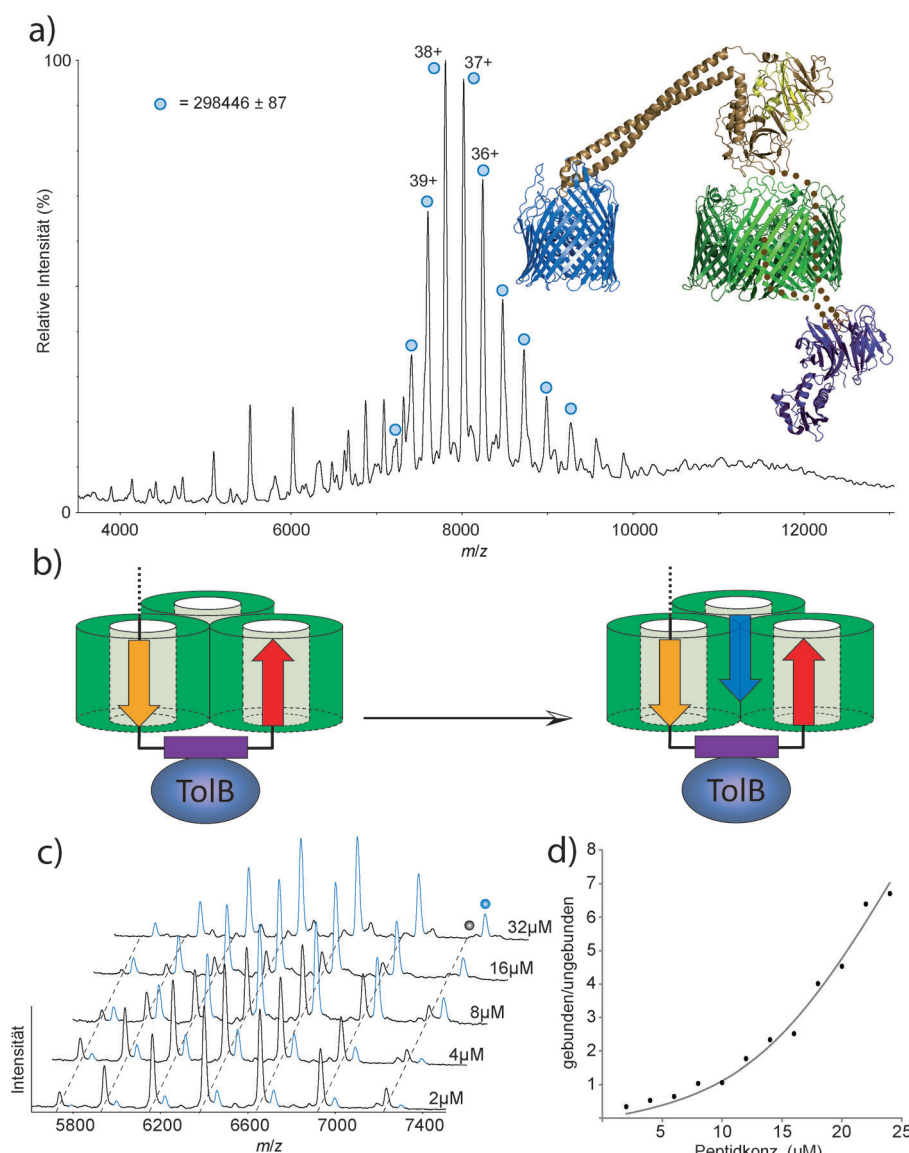
## 9. Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Aufsatz haben wir einige der ein-  
zigartigen Einblicke prä-  
sentiert, die mithilfe von  
MS-Verfahren zur Unter-  
suchung von Wechselwirkungen innerhalb von Proteinkom-  
plexen erhalten wurden. Die Stärke dieser Methode besteht  
in der Möglichkeit, komplexe Wechselwirkungskaskaden, die  
in Lösung stattfinden, simultan zu verfolgen. Dies verringert  
die Notwendigkeit, Wechselwirkungen in einem isolierten  
System zu studieren, und ermöglicht ihre Untersuchung in-  
nerhalb einer homogenen Präparation, wie es für den HSP90-  
Reaktionszyklus veranschaulicht wurde. Die Zeitskala des  
MS-Verfahrens ermöglicht außerdem eine Untersuchung in  
Echtzeit. Soweit Komplexe als polydisperse oligomere An-  
ordnungen vorliegen, bietet die MS eine exklusive Gelegen-  
heit, die dynamischen Auswirkungen von Untereinheiten auf  
die Struktur zu erforschen, was wiederum zur Funktion in  
Beziehung gesetzt werden kann.

Die Erfassung quantitativer Affinitätsdaten für Mem-  
brankomplexe, dargestellt am Beispiel des Colicin-Translo-  
kons und der Pgp-Komplexe, repräsentiert einige der ersten  
Beispiele, in denen Messungen von  $K_D$ -Werten für Mem-  
branproteinkomplexe durchgeführt wurden, und ebnet den  
Weg für viele Folgestudien. Vor kurzem wurden neue An-  
sätze für Untersuchungen von Membranproteinen aus Li-  
piddoppelschichten entwickelt.<sup>[81]</sup> Eine aktuelle Anwendung  
solubilisierter Doppelschichten besteht darin, die Wechsel-

suchung von Wechselwirkungen innerhalb von Proteinkom-  
plexen erhalten wurden. Die Stärke dieser Methode besteht  
in der Möglichkeit, komplexe Wechselwirkungskaskaden, die  
in Lösung stattfinden, simultan zu verfolgen. Dies verringert  
die Notwendigkeit, Wechselwirkungen in einem isolierten  
System zu studieren, und ermöglicht ihre Untersuchung in-  
nerhalb einer homogenen Präparation, wie es für den HSP90-  
Reaktionszyklus veranschaulicht wurde. Die Zeitskala des  
MS-Verfahrens ermöglicht außerdem eine Untersuchung in  
Echtzeit. Soweit Komplexe als polydisperse oligomere An-  
ordnungen vorliegen, bietet die MS eine exklusive Gelegen-  
heit, die dynamischen Auswirkungen von Untereinheiten auf  
die Struktur zu erforschen, was wiederum zur Funktion in  
Beziehung gesetzt werden kann.





**Abbildung 7.** a) Massenspektrum des vollständigen, aus zwei Detergenzmicellen freigesetzten Transmembran-Translokons (blaue Kreise). b, c) Die Zugabe zunehmender Konzentrationen eines Peptids, das das OmpF-Bindungssepitop von ColE9 repliziert, zu den proteolytierten Translokon-Fragmenten zeigte, dass nur ein Porin unbesetzt bleibt. d) Werte für die Affinität der OmpF-Peptidwechselwirkungen wurden in hervorragender Übereinstimmung mit den ITC-Befunden berechnet.

wirkung zwischen löslichen Proteinen und Nanoscheiben, die spezifische Glycosphingolipide (GSLs) enthalten, zu verfolgen.<sup>[82]</sup> Diese Entwicklungen zeigen Chancen auf, nativ-ähnliche bindende Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lipiden zu quantifizieren, die bislang für Komplexe erhalten wurden, die aus Detergenzmicellen freigesetzt wurden.

In diesem Aufsatz haben wir gezeigt, dass die MS mittlerweile so weit fortgeschritten ist, dass numerische Werte für Reaktionsgeschwindigkeiten und Bindungskonstanten erhalten werden können. Viele der anfänglichen Schwierigkeiten sind bereits überwunden wurden, besonders in Bezug auf nichtspezifische Bindung, Erhaltung hydrophober Wechselwirkungen und unerwünschte Dissoziation. Oftmals erfordert

die Akzeptanz quantitativer MS-Daten die Absicherung durch andere, parallel ausgeführte Verfahren. Ein vielfältiger Ansatz ist stets wünschenswert, wofür eine enge Verknüpfung der MS mit der ITC, EM oder Röntgenstrukturanalyse enorm wichtig ist, allerdings können Affinitäten nun ab initio mithilfe der MS hergeleitet werden. Nun, da wir in eine neue Ära der MS von Membranproteinen, Megadalton-Viren, Nanoscheiben und dynamischen Reaktionszyklen eintreten, ist es von Interesse, den möglichen Einfluss neuer instrumenteller Entwicklungen zu berücksichtigen. In diesem Zusammenhang dürften die Möglichkeiten zur höheren Massenauflösung mithilfe neuer Orbitrap-Modifizierungen,<sup>[83]</sup> zur Aufnahme nichtkovalenter Bindungsstellen mittels Elektroneneinfang-Dissoziation,<sup>[84]</sup> zur besseren Trennung bei Ionenmobilitätsmessungen<sup>[85]</sup> und zur engeren Verknüpfung mit der EM<sup>[86]</sup> dieses aufkeimende Forschungsgebiet für viele Jahre bereichern.

Wir danken insbesondere Julien Marcoux, Justin Benesch, Michal Sharon, Stephen Ambrose, Kallol Gupta, Ima-obong Ebong, Nicholas Housden, Carla Schmidt, Joseph Gault und Neil Oldham für hilfreiche Diskussionen und die Bereitstellung der Abbildungen. J.T.S.H wird über ein Medical Research Council Programme Grant an CVR (98101) finanziert. C.V.R wird über ein ERC grant IMPRESS (26851) und eine Royal Society Professorship finanziert.

Eingegangen am 26. März 2014

Online veröffentlicht am 29. Oktober 2014

Übersetzt von Dr. Farina Schill, Göttingen

- [1] A. C. Gingras, M. Gstaiger, B. Raught, R. Aebersold, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, 8, 645–654.
- [2] G. W. Li, X. S. Xie, *Nature* **2011**, 475, 308–315.
- [3] H. Kitano, *Science* **2002**, 295, 1662–1664.
- [4] K. Vuignier, J. Schappler, J.-L. Veuthey, P.-A. Carrupt, S. Martel, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 398, 53–66.
- [5] D. S. Hage, S. A. Tweed, *J. Chromatogr. B* **1997**, 699, 499–525.
- [6] N. H. H. Heegaard, R. T. Kennedy, *Electrophoresis* **1999**, 20, 3122–3133.

- [7] J. Fenn, M. Mann, C. Meng, S. Wong, C. Whitehouse, *Science* **1989**, 246, 64–71.
- [8] M. Karas, U. Bahr, T. Dulcks, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, 366, 669–676.
- [9] a) J. T. S. Hopper, A. Rawlings, J. P. Afonso, D. Channing, R. Layfield, N. J. Oldham, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, 23, 1757–1767; b) B. Ganem, Y. T. Li, J. D. Henion, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 6294–6296; c) V. Katta, B. T. Chait, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 8534–8535.
- [10] F. Sobott, H. Hernandez, M. G. McCammon, M. A. Tito, C. V. Robinson, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 1402–1407.
- [11] a) J. L. P. Benesch, B. T. Ruotolo, D. A. Simmons, C. V. Robinson, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 3544–3567; b) I. V. Chernushevich, B. A. Thomson, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 1754–1760; c) N. Tahallah, M. Pinkse, C. S. Maier, A. J. Heck, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, 15, 596–601; d) R. H. H. van den Heuvel, E. van Duijn, H. Mazon, S. A. Synowsky, K. Lorenzen, C. Versluis, S. J. J. Brouns, D. Langridge, J. van der Oost, J. Hoyes, A. J. R. Heck, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 7473–7483.
- [12] A. R. McKay, B. T. Ruotolo, L. L. Ilag, C. V. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 11433–11442.
- [13] M. Sharon, S. Witt, E. Glasmacher, W. Baumeister, C. V. Robinson, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 18448–18457.
- [14] J. Snijder, R. J. Rose, D. Veessler, J. E. Johnson, A. J. Heck, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 4112–4115; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 4020–4023.
- [15] a) J. A. Loo, *Mass Spectrom. Rev.* **1997**, 16, 1–23; b) C. Uetrecht, A. J. R. Heck, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 8398–8413; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 8248–8262.
- [16] a) D. P. Smith, S. E. Radford, A. E. Ashcroft, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 6794–6798; b) A. J. Baldwin, H. Lioe, C. V. Robinson, L. E. Kay, J. L. P. Benesch, *J. Mol. Biol.* **2011**, 413, 297–309.
- [17] J. J. Sims, A. Haririnia, B. C. Dickinson, D. Fushman, R. E. Cohen, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, 16, 883–U112.
- [18] a) Z. Hall, C. V. Robinson, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, 23, 1161–1168; b) I. A. Kaltashov, A. Mohimen, *Anal. Chem.* **2005**, 77, 5370–5379.
- [19] E. N. Kitova, A. El-Hawiet, P. D. Schnier, J. S. Klassen, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, 23, 431–441.
- [20] J. M. Daniel, S. D. Friess, S. Rajagopalan, S. Wendt, R. Zenobi, *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, 216, 1–27.
- [21] L. Liu, E. N. Kitova, J. S. Klassen, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, 22, 310–318.
- [22] a) L. Han, E. N. Kitova, M. Tan, X. Jiang, J. S. Klassen, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2014**, 25, 111–119; b) H. Lin, E. N. Kitova, J. S. Klassen, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2014**, 25, 104–110; c) Y. Z. Liu, B. Su, X. Wang, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, 26, 719–727.
- [23] a) P. W. Huang, T. Farkas, S. Marionneau, W. M. Zhong, N. Ruvoen-Clouet, A. L. Morrow, M. Altaye, L. K. Pickering, D. S. Newburg, J. LePend, X. Jiang, *J. Infect. Dis.* **2003**, 188, 19–31; b) P. W. Huang, T. Farkas, W. M. Zhong, S. Thornton, A. L. Morrow, J. Xi, *J. Virol.* **2005**, 79, 6714–6722.
- [24] L. Han, P. I. Kitov, E. N. Kitova, M. Tan, L. Y. Wang, M. Xia, X. Jiang, J. S. Klassen, *Glycobiology* **2013**, 23, 276–285.
- [25] A. El-Hawiet, E. N. Kitova, D. Arutyunov, D. J. Simpson, C. M. Szymanski, J. S. Klassen, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 3867–3870.
- [26] A. El-Hawiet, G. K. Shoemaker, R. Daneshfar, E. N. Kitova, J. S. Klassen, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 50–58.
- [27] a) B. T. Ruotolo, K. Giles, I. Campuzano, A. M. Sandercock, R. H. Bateman, C. V. Robinson, *Science* **2005**, 310, 1658–1661; b) C. Uetrecht, R. J. Rose, E. van Duijn, K. Lorenzen, A. J. R. Heck, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1633–1655.
- [28] A. El-Hawiet, E. N. Kitova, J. S. Klassen, *Anal. Chem.* **2013**, 85, 7637–7644.
- [29] I.-o. Ebong, N. Morgner, M. Zhou, M. A. Saraiva, S. Daturpalli, S. E. Jackson, C. V. Robinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 17939–17944.
- [30] L. Konermann, B. A. Collings, D. J. Douglas, *Biochemistry* **1997**, 36, 5554–5559.
- [31] a) L. Konermann, F. I. Rosell, A. G. Mauk, D. J. Douglas, *Biochemistry* **1997**, 36, 6448–6454; b) L. Konermann, D. J. Douglas, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, 12, 435–442; c) Y. L. Chen, J. M. Campbell, B. A. Collings, L. Konermann, D. J. Douglas, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, 12, 1003–1010.
- [32] J. Liu, L. Konermann, *Biochemistry* **2013**, 52, 1717–1724.
- [33] Z. L. Li, A. K. Sau, S. D. Shen, C. Whitehouse, T. Baasov, K. S. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9938–9939.
- [34] Z. Miao, H. Chen, P. Liu, Y. Liu, *Anal. Chem.* **2011**, 83, 3994–3997.
- [35] M. Peschke, U. H. Verkerk, P. Kebarle, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, 15, 1424–1434.
- [36] L. Konermann, E. Ahadi, A. D. Rodriguez, S. Vahidi, *Anal. Chem.* **2013**, 85, 2–9.
- [37] J. L. P. Benesch, B. T. Ruotolo, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, 21, 641–649.
- [38] a) L. Shimon, M. Sharon, A. Horovitz, *Biophys. J.* **2010**, 99, 1645–1649; b) L. A. Lane, B. T. Ruotolo, C. V. Robinson, G. Favrin, J. L. P. Benesch, *Int. J. Mass Spectrom.* **2009**, 283, 169–177.
- [39] J. X. Sun, E. N. Kitova, W. J. Wang, J. S. Klassen, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 3010–3018.
- [40] H. Lin, E. N. Kitova, J. S. Klassen, *Anal. Chem.* **2013**, 85, 8919–8922.
- [41] K. Sokratous, L. V. Roach, D. Channing, J. Strachan, J. Long, M. S. Searle, R. Layfield, N. J. Oldham, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 6416–6424.
- [42] J. L. P. Benesch, C. V. Robinson, *Nature* **2009**, 462, 576–577.
- [43] a) J. Sun, E. N. Kitova, J. S. Klassen, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 416–425; b) D. Cubrilovic, A. Biela, F. Sielaff, T. Steinmetzer, G. Klebe, R. Zenobi, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, 23, 1768–1777.
- [44] a) J. T. S. Hopper, K. Sokratous, N. J. Oldham, *Anal. Biochem.* **2012**, 421, 788–790; b) G. R. Hilton, G. K. Hochberg, A. Lagansky, S. I. McGinnigle, A. J. Baldwin, J. L. Benesch, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **2013**, 368, 20110405; c) J. T. S. Hopper, N. J. Oldham, *Anal. Chem.* **2011**, 83, 7472–7479.
- [45] J. Marcoux, C. V. Robinson, *Structure* **2013**, 21, 1541–1550.
- [46] a) R. Franski, B. Gierczyk, T. Kozik, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, 22, 2747–2749; b) V. Gabelica, N. Galic, E. De Pauw, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, 13, 946–953; c) B. Kralj, A. Smidovnik, J. Kobe, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, 23, 171–180.
- [47] a) L. Liu, D. Bagal, E. N. Kitova, P. D. Schnier, J. S. Klassen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 15980–15981; b) L. Liu, K. Michelsen, E. N. Kitova, P. D. Schnier, J. S. Klassen, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 17658–17660.
- [48] K. Barylyuk, R. M. Balabin, D. Gruenstein, R. Kikkeri, V. Frankevich, P. H. Seeberger, R. Zenobi, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, 22, 1167–1177.
- [49] K. Breuker, F. W. McLafferty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 18145–18152.
- [50] J. Kuriyan, D. Eisenberg, *Nature* **2007**, 450, 983–990.
- [51] a) W. Chazin, T. D. Veenstra, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, 13, 548–555; b) P. M. Gehrig, C. H. You, R. Dallinger, C. Gruber, M. Brouwer, J. H. R. Kagi, P. E. Hunziker, *Protein Sci.* **2000**, 9, 395–402.
- [52] H. Rogniaux, S. Sanglier, K. Strupat, S. Azza, O. Roitel, V. Ball, D. Tritsch, G. Branlant, A. Van Dorsselaer, *Anal. Biochem.* **2001**, 291, 48–61.

- [53] D. Cubrilovic, W. Haap, K. Barylyuk, A. Ruf, M. Badertscher, M. Gubler, T. Tetaz, C. Joseph, J. Benz, R. Zenobi, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 218–226.
- [54] A. Dyachenko, R. Gruber, L. Shimon, A. Horovitz, M. Sharon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 7235–7239.
- [55] A. Horovitz, K. R. Willison, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 646–651.
- [56] D. Picard, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 1640–1648.
- [57] N. Morgner, C. V. Robinson, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 2939–2948.
- [58] R. J. Rose, A. F. Labrijn, E. T. J. van den Bremer, S. Loverix, I. Lasters, P. H. C. van Berkel, J. G. J. van de Winkel, J. Schuurman, P. W. H. I. Parren, A. J. R. Heck, *Structure* **2011**, *19*, 1274–1282.
- [59] C. Uetrecht, N. R. Watts, S. J. Stahl, P. T. Wingfield, A. C. Steven, A. J. R. Heck, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 13368–13371.
- [60] S. Kang, L. M. Oltrogge, C. C. Broomell, L. O. Liepold, P. E. Prevelige, M. Young, T. Douglas, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16527–16529.
- [61] M. Haslbeck, T. Franzmann, D. Weinfurter, J. Buchner, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 842–846.
- [62] a) J. Horwitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 10449–10453; b) J. P. Brady, D. Garland, Y. Douglas-Tabor, W. G. Robison, A. Groome, E. F. Wawrousek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 884–889.
- [63] H. Ecroyd, J. A. Carver, *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 62–81.
- [64] J. Horwitz, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2000**, *11*, 53–60.
- [65] J. A. Aquilina, J. L. P. Benesch, L. L. Ding, O. Yaron, J. Horwitz, C. V. Robinson, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 14485–14491.
- [66] A. J. Painter, N. Jaya, E. Basha, E. Vierling, C. V. Robinson, J. L. P. Benesch, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 246–253.
- [67] F. Sobott, J. L. P. Benesch, E. Vierling, C. V. Robinson, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 38921–38929.
- [68] a) L. L. Ilag, H. Videler, A. R. McKay, F. Sobott, P. Fucini, K. H. Nierhaus, C. V. Robinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 8192–8197; b) C. L. Hanson, H. Videler, C. Santos, J. P. G. Ballesta, C. V. Robinson, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 42750–42757.
- [69] A. A. D. Beauclerk, E. Cundliffe, J. Dijk, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 6559–6563.
- [70] S. Deroo, S.-J. Hyung, J. Marcoux, Y. Gordiyenko, R. K. Kori-pella, S. Sanyal, C. V. Robinson, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1120–1127.
- [71] a) M. J. M. Saraiva, *Hum. Mutat.* **1995**, *5*, 191–196; b) V. Plante-Bordeneuve, T. Lalu, M. Misrahi, M. M. Reilly, D. Adams, C. Lacroix, G. Said, *Neurology* **1998**, *51*, 708–714; c) Y. Sekijima, R. L. Wiseman, J. Matteson, P. Hammarstrom, S. R. Miller, A. R. Sawkar, W. E. Balch, J. W. Kelly, *Cell* **2005**, *121*, 73–85.
- [72] C. A. Keetch, E. H. C. Bromley, M. G. McCammon, N. Wang, J. Christodoulou, C. V. Robinson, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 41667–41674.
- [73] a) N. P. Barrera, N. Di Bartolo, P. J. Booth, C. V. Robinson, *Science* **2008**, *321*, 243–246; b) N. P. Barrera, C. V. Robinson, *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 247–271; c) A. Laganowsky, E. Reading, J. T. Hopper, C. V. Robinson, *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 639–651.
- [74] J. Marcoux, S. C. Wang, A. Politis, E. Reading, J. Ma, P. C. Biggin, M. Zhou, H. Tao, Q. Zhang, G. Chang, N. Morgner, C. V. Robinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 9704–9709.
- [75] R. J. Dawson, K. P. Locher, *Nature* **2006**, *443*, 180–185.
- [76] G. Szakács, J. K. Paterson, J. A. Ludwig, C. Booth-Genthe, M. M. Gottesman, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 219–234.
- [77] S. G. Aller, J. Yu, A. Ward, Y. Weng, S. Chittaboina, R. Zhuo, P. M. Harrell, Y. T. Trinh, Q. Zhang, I. L. Urbatsch, G. Chang, *Science* **2009**, *323*, 1718–1722.
- [78] B. Verhalen, S. Ernst, M. Borsch, S. Wilkens, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 1112–1127.
- [79] a) I. Hänel, D. Wunnicke, E. Bordignon, H.-J. Steinhoff, D. J. Slotboom, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, *20*, 210–214; b) E. R. Georgieva, P. P. Borbat, C. Ginter, J. H. Freed, O. Boudker, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, *20*, 215–221.
- [80] a) A. J. Borysik, D. J. Hewitt, C. V. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6078–6083; b) S. C. Wang, A. Politis, N. Di Bartolo, V. N. Bavro, S. J. Tucker, P. J. Booth, N. P. Barrera, C. V. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15468–15470.
- [81] a) M. T. Marty, H. Zhang, W. Cui, M. L. Gross, S. G. Sligar, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2013**, *25*, 269–277; b) J. T. S. Hopper, Y. T.-C. Yu, D. Li, A. Raymond, M. Bostock, I. Liko, V. Mikhailov, A. Laganowsky, J. L. P. Benesch, M. Caffrey, D. Nietlispach, C. V. Robinson, *Nat. Methods* **2013**, *10*, 1206–1208.
- [82] Y. X. Zhang, L. Liu, R. Daneshfar, E. N. Kitova, C. S. Li, F. Jia, C. W. Cairo, J. S. Klassen, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7618–7621.
- [83] R. J. Rose, E. Damoc, E. Denisov, A. Makarov, A. J. R. Heck, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 1084–1086.
- [84] a) Y. Xie, J. Zhang, S. Yin, J. A. Loo, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14432–14433; b) H. Zhang, W. Cui, J. Wen, R. E. Blankenship, M. L. Gross, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 5598–5606.
- [85] a) K. Giles, J. P. Williams, I. Campuzano, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 1559–1566; b) S. I. Merenbloom, R. S. Glaskin, Z. B. Henson, D. E. Clemmer, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1482–1487.
- [86] J. L. P. Benesch, B. T. Ruotolo, D. A. Simmons, N. P. Barrera, N. Morgner, L. C. Wang, R. Helen, C. V. Robinson, *J. Struct. Biol.* **2010**, *172*, 161–168.