

Analyse der Proteinphosphorylierung und anderer kovalenter
Proteinmodifikationen mit Elektrospray-Massenspektrometrie

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim
Fachbereich 14 - Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

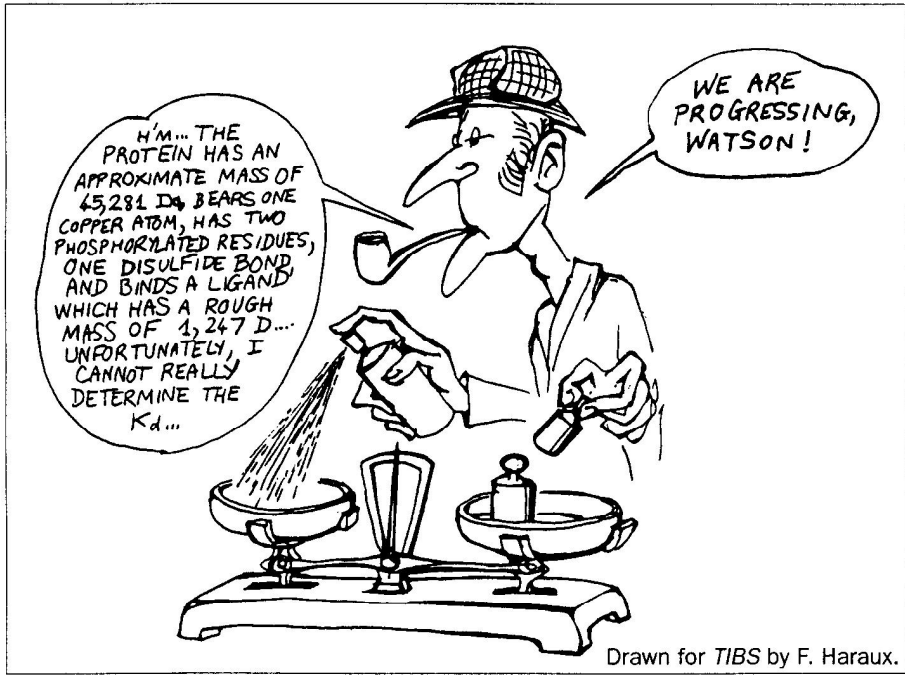
von Andreas Schlosser
aus Neuendettelsau

Frankfurt am Main (2002)
(DF1)

vom Fachbereich 14 - Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. W.E. Müller
Gutachter: Prof. Dr. M. Karas
Prof. Dr. W.D. Lehmann

Datum der Disputation:



Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Posttranslationale Proteinmodifikationen	7
1.2	Biologische Massenspektrometrie	17
2	Material und Methoden	25
2.1	Chemikalien	25
2.2	Peptidsynthese	25
2.3	Präparation der katalytischen Untereinheit der PKA	25
2.4	Gelelektrophorese	27
2.5	Enzymatische und chemische Spaltung von Proteinen	27
2.5.1	Bromcyanspaltung	27
2.5.2	Enzymatische Spaltung	27
2.5.3	In-Gel-Verdau	28
2.6	Entsalzung	29
2.7	Metallaffinitätschromatographie	29
2.8	Präparation der nanoESI-Kapillaren	29
2.9	Massenspektrometer	30
2.10	Datenbanksuche und Datenanalyse	31
3	Analyse der Proteinphosphorylierung	33
3.1	Einleitung	33
3.1.1	Selektive Detektion von Phosphopeptiden	34
3.1.2	Selektive Anreicherung von Phosphopeptiden	39
3.1.3	Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle	41
3.2	Neutralverlust-Scan	41
3.3	Metallaffinitätschromatographie	58

4 Analyse kovalenter Proteinmodifikationen	73
4.1 Einleitung	73
4.2 Kovalente Modifikationen der PKA	76
4.3 Myristoylierung von GAPR-1	84
4.4 „Top-Down“-Analyse: Dynamin A	85
5 Analyse der Domänenstruktur von Proteinen	93
5.1 Einleitung	93
5.2 Domänenstruktur von Dynamin A	93
6 Zusammenfassung	99
Literaturverzeichnis	101
Anhang	117
Sequenzen analysierter Proteine	
Verwendete Abkürzungen	
Publikationen	
Konferenzbeiträge	
Lebenslauf	
Danksagung	

Kapitel 1

Einleitung

Proteine spielen bei den meisten zellulären Prozessen eine Hauptrolle, sie sind die Werkzeuge der Zelle und werden für die unterschiedlichsten Aufgaben, wie beispielsweise für die Katalyse biochemischer Reaktionen, den Transport von Molekülen (z.B. Sauerstoff oder Lipide) oder für die Immunabwehr eingesetzt. Alle Proteine werden aus den gleichen 20 Aminosäuren aufgebaut, deren Abfolge (Sequenz) in den Genen des jeweiligen Organismus codiert ist. Die Information, die durch die Entschlüsselung von Genen oder ganzen Genomen (Adams et al., 2000; Venter et al., 2001) erhalten wird, ist also in erster Linie eine Information über das Protein-Repertoire eines bestimmten Organismus, und ein wesentliches Ziel des Humangenomprojektes und anderer Genomprojekte ist eine komplette Zusammenstellung aller Gene, die dann als eine Art Periodensystem der biomedizinischen Forschung dienen könnte. Auch wenn im Genom eines Organismus die Sequenzen aller Proteine verschlüsselt sind, lassen sich aus den genomischen Daten nur begrenzt Rückschlüsse auf das Proteom einer Zelle ziehen, da von einer bestimmten Zelle immer nur ein kleiner Bruchteil der im Genom codierten Proteine exprimiert wird. Hinzu kommt eine Fülle von co- und posttranslationalen Proteinmodifikationen, durch die die Struktur, Funktion und Lokalisation eines Proteins entscheidend beeinflusst werden, über die aber genomische Daten keine Auskunft geben können.

1.1 Posttranslationale Proteinmodifikationen

Die große Mehrzahl der in einer Zelle exprimierten Proteine ist co- oder posttranslational modifiziert. Die zwei häufigsten Modifikationen sind die Entfernung des N-terminalen Methionins und die N-terminale Acetylierung (Polevoda & Sherman, 2000). Beide Modifikationen korrelieren mit der Stabilität und dem Turnover der entsprechenden Proteine. Daneben sind in der Literatur über 200 weitere kovalente Proteinmodifikationen beschrie-

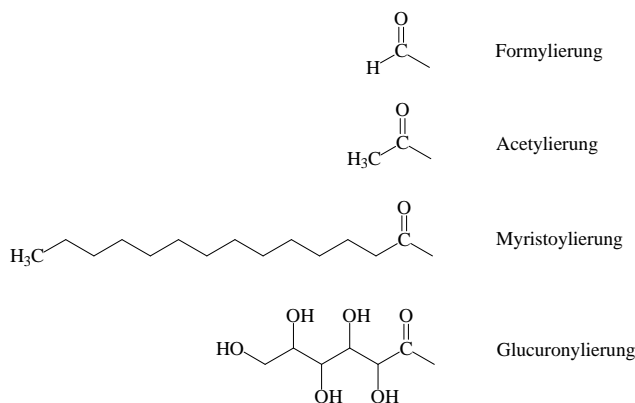


Abbildung 1.1: Strukturformeln häufiger N-terminaler Proteinmodifikationen. Die Formylierung, die Acetylierung und die Myristoylierung haben eine biologische Funktion, die Modifikation mit Glucuronsäure vermutlich nicht.

ben (Krishna & Wold, 1998; Nalivaeva & Turner, 2001), von denen die wichtigsten im Folgenden kurz beschrieben werden sollen.

N-terminale Modifikationen

Der N-Terminus ist bei einer großen Zahl von Proteinen durch Acylierung modifiziert (siehe Abbildung 1.1). Die Proteinbiosynthese beginnt bei allen eukaryotischen Proteinen mit Methionin und bei allen prokaryotischen Proteinen mit Formylmethionin. Bei der Mehrzahl der Proteine wird die N-terminale Aminosäure aber cotranslational wieder entfernt. Diese Abspaltung wird durch sog. Methioninaminopeptidasen katalysiert, deren Spezifität von der benachbarten Aminosäure abhängig ist: das N-terminale Methionin wird nur abgespalten, wenn sich an Position zwei eine der sieben kleinsten Aminosäuren befindet. Obwohl die Abspaltung des N-terminalen Methionins eine relative simple Modifikation darstellt, hat die Deletion der Gene für die Methioninaminopeptidasen sowohl in Bakterien als auch in Hefe letale Folgen.

Die Acetylierung des N-Terminus ist bei eukaryotischen Proteinen häufig zu finden, bei prokaryotischen hingegen nur selten. Für die Acetylierung gibt es keine bekannte Konsensus-Sequenz, wenngleich Serin und Alanin an der N-terminalen Position bevorzugt sind. Eine wichtige regulatorische Funktion hat die Acetylierung beispielsweise bei den Histonen, wo mittels reversibler Acetylierung DNA-abhängige Prozesse, einschließlich der Transkription, gesteuert werden (Wade et al., 1997).

Die Myristoylierung erfolgt cotranslational und erfordert an Position 1 ein Glycin. Darüber hinaus findet man bei myristoylierten Proteinen an Position 5 häufig ein Serin oder Threonin und an Position 6 oder 7 häufig ein Lysin oder Arginin. Viele Signalproteine wie Proteinkinasen, Proteinphosphatasen, G-Proteine und Ca^{2+} -bindende Proteine sind N-terminal durch Myristinsäure modifiziert. Die Myristoylierung wird häufig für die

Membranassoziation eines Proteins benötigt, wenngleich die Myristinsäure alleine dafür nicht ausreichend ist. Die stabile Membranbindung eines myristoylierten Proteins kann z.B. über zusätzliche elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den sauren Kopfgruppen der Phospholipide und einem Cluster aus basischen Aminosäuren erfolgen (McLaughlin & Aderem, 1995). Ein gut untersuchtes Beispiel für diesen sog. *Myristoyl-Electrostatic Switch* ist das MARCKS-Protein (Myristoyl Alanine-Rich C-Kinase Substrate), das nach der Phosphorylierung in seiner basischen Region durch die Protein Kinase C von der Membran abdissoziiert (Aderem, 1992).

Eine nicht enzymatisch kontrollierte N-terminale Acylierung ist bei der rekombinanten Expression von Proteinen in Bakterienzellen zu beobachten. Hier kommt es zu einer Reaktion der freien N-terminalen Aminogruppe mit 6-Phosphoglucono-1,5-lacton, einem Intermediat des Pentosephosphatweges (Geoghegan et al., 1999; siehe Kapitel 4.2).

Lipid-artige Modifikationen

Neben der Myristoylierung gibt es noch eine Reihe weiterer Lipid-artiger Modifikationen, wie etwa die Palmitoylierung, die Prenylierung, die Modifizierung mit Cholesterin oder die kovalente Verknüpfung eines Proteins mit einem sog. GPI-Anker (siehe Abbildung 1.2). Alle diese Modifikationen stehen im Zusammenhang mit einer Membranlokalisierung der entsprechenden Proteine. Die Acylierung von Proteinen mit Palmitinsäure erfolgt an Cystein-Resten und ist im Gegensatz zur Myristoylierung reversibel. Ein Beispiel für die Membranassoziation eines Proteins mittels Palmitoylierung ist Rhodopsin, das durch zwei eng benachbarte Palmitoylreste in der Membran verankert ist. Während die Palmitoylierung über eine Thioesterbindung erfolgt, wird bei der Prenylierung eine Thioetherbindung gebildet. Die Prenylierung von Proteinen findet an einem Cystein-Rest in der Nähe des C-Terminus statt. Je nach Konsensus-Sequenz wird der Cystein-Rest mit einer Farnesyl- oder mit einer Geranylgeraniol-Gruppe verknüpft. Die Aminosäuren auf der C-terminalen Seite des modifizierten Cysteins werden daraufhin abgespalten, und die freie Carboxygruppe des Cysteins wird schließlich in den Methylester verwandelt, wodurch ein stark hydrophober C-Terminus entsteht. Bei dem Signalprotein Ras erfolgt die Assoziation mit der Plasmamembran über einen Farnesyl-Rest. Eine andere Lipid-artige Modifikation, der sog. GPI-Anker (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) wird verwendet, um Proteine an der Außenseite der Plasmamembran zu verankern. Auch Cholesterin wird von der Zelle als Lipid-artige Modifikation für die Membranassoziation von Proteinen eingesetzt (Porter et al., 1996). Eine bis dahin unbekannte Lipid-artige Modifikation wurde 2001 von Lindorff-Larsen et al. an einem Pflanzenprotein (LTP1) gefunden und charakterisiert (Lindorff-Larsen et al., 2001): LTP1 ist an einem Aspartat-Rest mit der OH-Gruppe einer hydroxylierten Oxo-ungesättigten Fettsäure verestert.

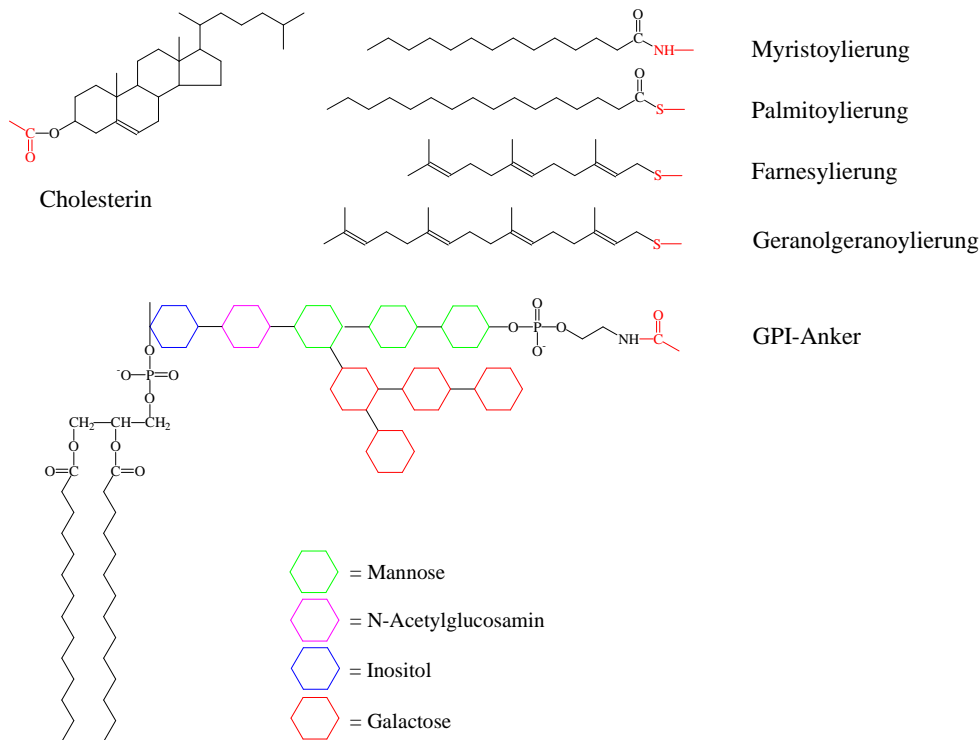


Abbildung 1.2: Strukturformeln der wichtigsten Lipid-artigen Proteinmodifikationen. Die Myristoylierung erfolgt N-terminal, die Verknüpfung mit dem GPI-Anker und die Modifikation mit Cholesterin erfolgen am C-Terminus. Die Palmitoylierung (Thioesterbindung) findet an einem Cys-Rest in der Nähe des N-Terminus statt, die Farnesylierung und die Geranylgeranoylierung (Thioetherbindung) erfolgen an einem Cys-Rest in der Nähe des C-Terminus. Alle Modifikationen dienen der Membranverankerung der entsprechenden Proteine.

Phosphorylierung

Proteinphosphorylierung ist an Ser, Thr, Tyr, Arg, Lys, His, Asp, Glu und Cys zu beobachten (Cozzzone, 1993). Während in Prokaryoten vor allem die Phosphorylierung an His und Asp intensiv genutzt wird (Stock et al., 1989), kommt in Eukaryoten der Phosphorylierung an Ser, Thr und Tyr besondere Bedeutung zu. Sie stellt hier die wichtigste posttranslationale Proteinmodifikation mit regulatorischer Funktion dar. Die Phosphorylierung an Ser-Resten findet dabei etwa zehnmal so häufig statt wie die Phosphorylierung an Thr-Resten, die Thr-Phosphorylierung ist wiederum etwa zehnmal häufiger als die Tyr-Phosphorylierung. Die Veresterung der alkoholischen bzw. phenolischen OH-Gruppen wird durch Proteinkinasen katalysiert, die ATP als Co-Substrat verwenden, die Hydrolyse der Phosphosäureester wird durch Proteinphosphatasen katalysiert (Abbildung 1.3). Sowohl die eukaryotischen Proteinkinasen als auch die eukaryotischen Proteinphosphatasen lassen sich in zwei Klassen mit Ser/Thr-Spezifität und mit Tyr-Spezifität einteilen (Hanks &

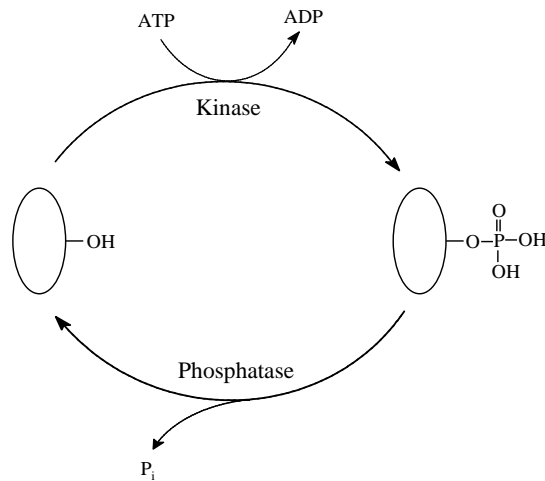


Abbildung 1.3: Reversible Proteinphosphorylierung von Ser-, Thr- und Tyr-Resten. Die Phosphorylierung wird durch Proteinkinasen katalysiert, die das γ -Phosphat von ATP auf die Aminosäuren übertragen. Die Dephosphorylierung wird durch Proteinphosphatasen katalysiert.

Hunter, 1995). Es werden aber auch Enzyme mit dualer Spezifität, wie beispielsweise die MAP-Kinase-Kinase, beschrieben (Seeger & Krebs, 1995).

Die biologische Bedeutung der Phosphorylierung in höheren Eukaryoten lässt sich schon anhand der Vielzahl unterschiedlicher Kinasen und Phosphatasen erkennen, die in diesen Organismen exprimiert werden. Eine Analyse des Genoms von *Caenorhabditis elegans* ergab beispielsweise, dass Proteinkinase-Domänen bei dieser Spezies nach den Transmembran-Rezeptoren (650 Domänen, 3,5 % des Genoms) die zweitgrößte Proteindomänen-Familie (496 Domänen, 2,6 % des Genoms) bilden (Plowman et al., 1999). Die Auswertung der humanen Genomdaten hat ergeben, dass die Anzahl der menschlichen Proteinkinasen in der gleichen Größenordnung (etwas über 500 Kinasen) liegt (Venter et al., 2001). Es wird vermutet, dass ein großer Teil aller zellulären Proteine durch reversible Phosphorylierung modifiziert werden kann (Hubbard & Cohen, 1993).

Die reversible Phosphorylierung ist ein Mechanismus, der es der Zelle ermöglicht schnell, d.h. ohne eine Änderung der Genexpression und ohne die zeitaufwendige Neusynthese von Proteinen, auf extrazelluläre Signale zu reagieren. Dabei wirkt die Phosphorylierung wie ein molekularer Schalter: durch die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung einer spezifischen Aminosäure werden Enzyme aktiviert oder deaktiviert. Auch die meisten Kinasen und Phosphatasen werden in ihrer Aktivität durch reversible Phosphorylierung reguliert. Ein bis in die molekularen Details geklärtes Beispiel hierfür ist die Src-Kinase. Diese Tyr-spezifische Kinase wird in ihrer Aktivität im Wesentlichen über eine Phosphorylierung an Tyr527 reguliert: in der phosphorylierten Form bindet die SH2-Domäne des Proteins an das Phosphotyrosin, und das Enzym nimmt eine geschlossene Konformation ein, in der es katalytisch inaktiv ist. In der dephosphorylierten Form hat das Enzym eine offene Konformation und ist katalytisch aktiv (Xu et al., 1999). Zusätzlich wird die Kinase über eine Phosphorylierung an Tyr416 reguliert: das Enzym erreicht seine maximale katalytische

Aktivität, wenn diese Aminosäure im sog. Aktivierungs-Loop phosphoryliert ist (Kmieciak & Shalloway, 1987).

Die meisten Kinasen unterliegen der Autophosphorylierung, sind aber auch oft Substrate für andere Kinasen. Dadurch entstehen in der Zelle Phosphorylierungs-Netzwerke und -Kaskaden. Eine gut untersuchte Beispiel einer Phosphorylierungskaskade ist die der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) (Nishida & Gotoh, 1993; Pelech, 1993), die von einem breiten Spektrum an extrazellulären Wachstums- und Differenzierungs-Signalen aktiviert werden. Für die volle Aktivität der MAP-Kinase muss diese an einem Ser- und an einem Tyr-Rest phosphoryliert werden. Beide Phosphorylierungen werden durch die MAP-Kinase-Kinase katalysiert, deren Aktivierung wiederum durch die MAP-Kinase-Kinase-Kinase erfolgt. Ist die MAP-Kinase aktiviert, phosphoryliert sie in der Zelle weitere Proteinkinasen und genregulatorische Proteine wie beispielsweise den Transkriptionsregulator Jun. Eine solche Phosphorylierungskaskade hat zum einen einen großen Verstärkungseffekt, zum anderen bietet sie die Möglichkeit zur Wechselwirkung mit anderen Signalwegen (*cross-talk*).

Phosphorylierung spielt bei fast allen zellulären Mechanismen eine wichtige Rolle (Hunter, 1995; Hunter, 2000). So wird beispielsweise der Zellzyklus durch die sog. Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (Cdk) gesteuert, die in ihrer enzymatischen Aktivität durch verschiedene Cycline reguliert werden. Die Cyclin-abhängigen Proteinkinasen phosphorylieren ihre Substratproteine an spezifischen Ser- und Thr-Resten, was im weiteren zu einer Aktivierung der Mitose- bzw. der DNA-Replikations-Maschinerie führt. Auch bei der Aktivierung der DNA-Reparatur-Maschinerie kommt Kinasen eine Schlüsselrolle zu: durch DNA-Schäden werden die sog. DNA-abhängigen Proteinkinasen (DNA-PK) aktiviert; dies führt zu einer Phosphorylierung spezifischer Transkriptionsregulatoren und in der Folge zu einem Zellzyklus-Arrest und zur verstärkten Expression von DNA-Reparaturenzymen. Eine ähnliche zentrale Funktion hat die Proteinphosphorylierung bei einer Vielzahl weiterer zellulärer Mechanismen, wie beispielsweise beim programmierten Zelltod (Apoptosis), dem Abbau von Proteinen, dem Transport von Proteinen in und aus dem Zellkern und der Regulation des Auf- und Abbaus des Cytoskeletts.

Da die Proteinphosphorylierung an vielen molekularen Mechanismen beteiligt ist, die mit der Wachstumskontrolle von Zellen zu tun haben, ist es nicht verwunderlich, dass eine ganze Reihe von Kinase-Genen, wie beispielsweise das Gen für die Src-Kinase oder für die Abl-Kinase, Protoonkogene darstellen. Mutationen, die zu einer konstitutiven Aktivierung und damit zum Verlust der Regulierbarkeit solcher Kinasen führen, spielen bei der Transformation einer Zelle zur Krebszelle oftmals eine wichtige Rolle. Darüber hinaus sind viele Onkoproteine und viele Tumorsuppressorproteine Phosphoproteine. Ein Beispiel für ein

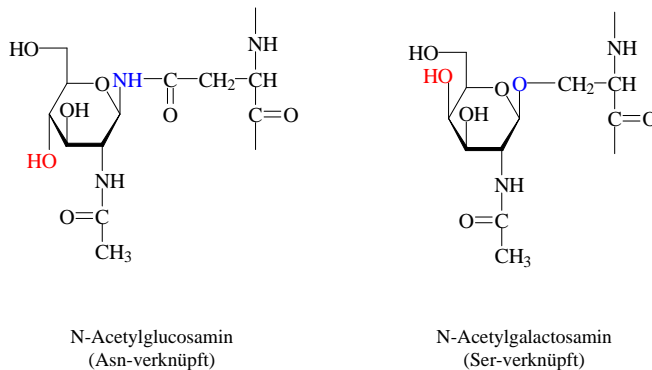


Abbildung 1.4: Strukturformeln von N-Acetylglucosamin (N-gekoppelt) und N-Acetylgalactosamin (O-gekoppelt). Die Anknüpfung von Oligosacchariden an Proteine finden in den meisten Fällen über diese beiden Reste statt. N-gekoppelte Oligosaccharide kommen weitaus häufiger vor als O-gekoppelte Oligosaccharide.

Tumorsuppressorprotein ist das Retinoblastom-Protein (Rb), dessen Mutation maßgeblich für die Entstehung des Retinoblastoms, einem Tumor der Embryonalzellen, aus denen die Netzhaut des Auges entsteht, verantwortlich ist. Rb ist ein Regulator des Zellzyklus und unterliegt einer zellzyklusabhängigen Phosphorylierung (Weinberg, 1995), über die seine Funktion als Wachstumsbegrenzer reguliert wird. Ist die reversible Phosphorylierung von Rb gestört, so kann das Protein seine Funktion als Wachstumsbegrenzer nicht mehr erfüllen (Harbour et al., 1999).

Glykosylierung

Die Mehrzahl der eukaryotischen Membranproteine, sowie die meisten extrazellulären Proteine sind glykosyliert. Die kovalente Anknüpfung der Kohlenhydrate findet im Endoplasmatischen Reticulum und im Golgi-Apparat statt. Die Zuckerreste werden entweder N-glycosidisch mit einem Asn-Rest oder O-glycosidisch mit einem Ser- oder Thr-Rest verknüpft, wobei die N-gekoppelten Oligosaccharide weitaus häufiger vorkommen als die O-gekoppelten. Der direkt an Asn, Ser oder Thr geknüpfte Zuckerrest ist in den meisten Fällen N-Acetylglucosamin oder N-Acetylgalactosamin (siehe Abbildung 1.4), die Konsensus-Sequenz der N-Glycosylierung ist N-X-S/T. Bei Säugetieren findet man bei den N-gekoppelten Oligosacchariden zwei große Klassen: die komplexen und die Mannose-reichen Oligosaccharide. Die komplexen Oligosaccharide enthalten neben N-Acetylglucosamin, N-Acetylgalactosamin und Mannose auch Galactose-, Sialinsäure- und Fucose-Reste. Der Sialinsäure kommt eine besondere Bedeutung zu, da sie als einziger Zuckerrest eine negative Ladung trägt. Die unterschiedlichen Zuckereinheiten können auf unterschiedliche Weise verknüpft sein (z.B. (1,2), (1,4), (1,6), oder (2,3)) und sich in der Konfiguration des C₁-Kohlenstoffatoms (α - oder β -glycosidische Verknüpfung) unterscheiden. Durch die Vielzahl der Verknüpfungs- und Verzweigungsmöglichkeiten ist die Glycosylierung eine

äußerst informationsreiche Modifikation: durch unterschiedliche Glycosylierungen können sehr individuelle Strukturen generiert werden, die selektiv von bestimmten Enzymen oder Rezeptoren erkannt werden.

Die Oligosaccharide von Membranproteinen befinden sich immer an der äußeren Oberfläche der Plasmamembran, wo sie beispielsweise bei der Zell-Zell-Erkennung eine wichtige Rolle spielen. Zu den löslichen Glycoproteinen zählen z.B. die Immunglobuline und bestimmte Carrier-Proteine des Blutes. Die Sialinsäure an den Enden der Oligosaccharid-Ketten von löslichen Glycoproteinen bestimmt, ob ein Protein weiter im Blutstrom zirkuliert oder ob es von Leberzellen aufgenommen und abgebaut wird. Diese Aufgabe wird von den sog. Asialoglycoprotein-Rezeptoren wahrgenommen, die sich auf der Oberfläche von Leberzellen befinden.

Proteolytische Spaltung

Der gezielte Abbau von Proteinen ist ein wichtiger Mechanismus zur Kontrolle der Enzymkonzentration in der Zelle. Der wichtigste eukaryotische Mechanismus zum gezielten Abbau von Proteinen ist die Ubiquitinierung. Ubiquitin ist ein kleines (8.5 kDa) Protein, das in allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Proteine werden für den Abbau markiert, indem mehrere Ubiquitin-Moleküle kovalent mit der Aminogruppe eines Lys-Restes verknüpft werden. Die ubiquitinierten Proteine werden dann vom sog. Proteasom erkannt und in kleine Peptide gespalten (Hershko et al., 2000). Eine andere posttranslationale Modifikation, die Proteine für den Abbau markiert, ist die N-terminale Addition eines Arginins. Diese kovalente Modifikation spielt vermutlich auch beim programmierten Zelltod eine Rolle (Fissolo et al., 2000). Die proteolytische Spaltung von Proteinen wird nicht nur zum Abbau von Proteinen eingesetzt, sondern auch zur Aktivierung von sog. Zymogenen, inaktiven Vorstufen von Enzymen. Auf diese Weise werden viele Proteasen, wie z.B. Trypsin oder Chymotrypsin, aber auch Hormone (Insulin) und Proteine, die an der Blutgerinnung beteiligt sind, aktiviert.

Protein-Spleißen

Eine besonders ungewöhnliche posttranslationale Modifikation ist das sog. Protein-Spleißen (Noren et al., 2000). Was auf Ebene der mRNA schon lange bekannt ist, das „Herausschneiden“ interner Sequenzen (Introns), wurde 1990 auch auf der Proteinebene nachgewiesen (Kane et al., 1990; Hirata et al., 1990). Die internen Sequenzen, die durch die autokatalytische Spleißreaktion aus der Proteinvorstufe entfernt werden, nennt man Inteine. Inzwischen wurden über 100 solcher Inteine in einzelligen Organismen (Eubakterien, Archaeobakterien und Eukaryoten) gefunden (www.neb.com/neb/inteins.html). Der Mechanismus des Protein-Spleißens verläuft intramolekular und erfordert keine exogenen

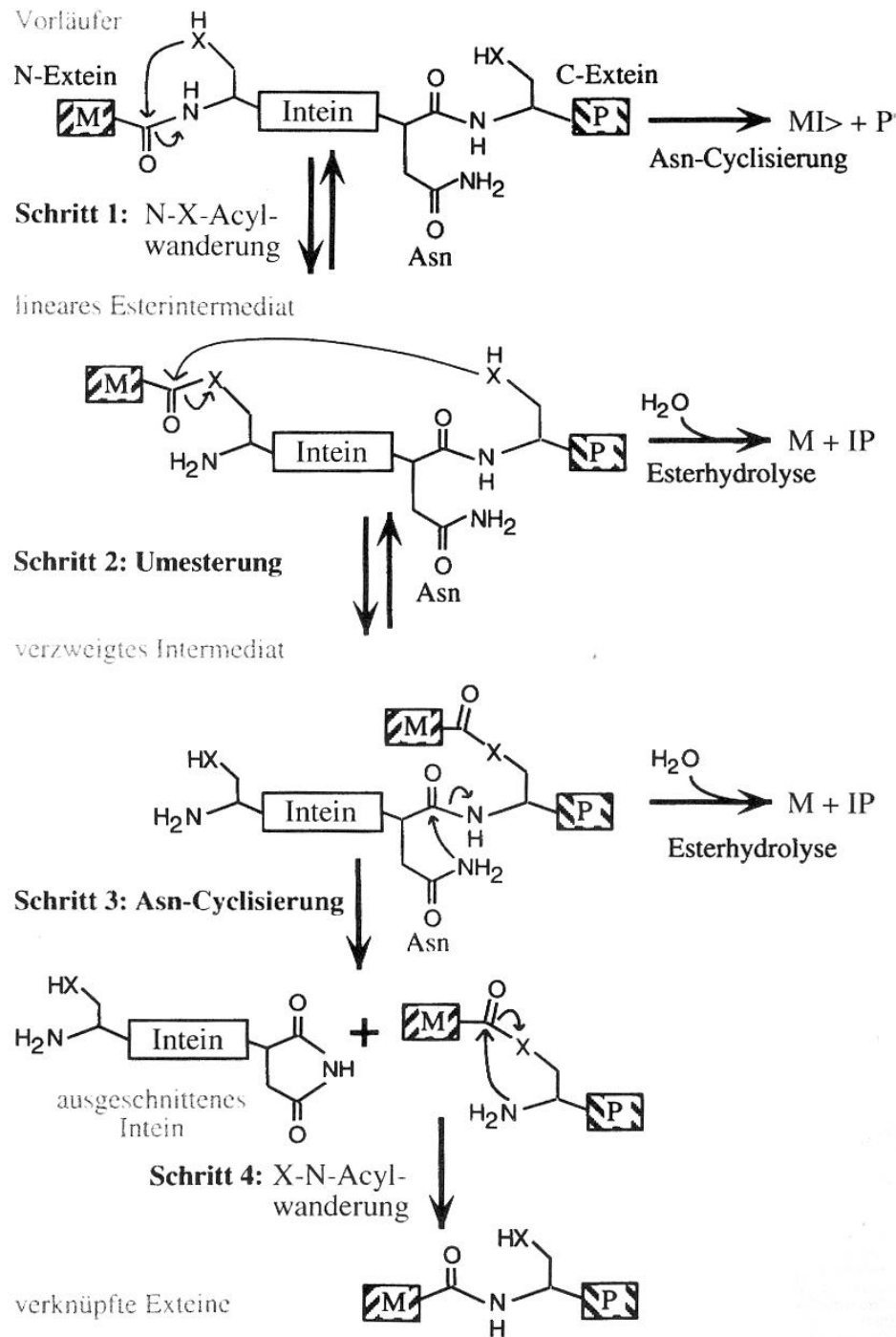


Abbildung 1.5: Gegenwärtig akzeptierter Mechanismus des Protein-Speißens nach Noren et al. (Noren et al., 2000).

Cofaktoren. Alle notwendigen Informationen sind in der Polypeptidkette des Inteins und der ersten Extein-Aminosäure an der C-terminalen Spleißstelle enthalten. Der gegenwärtig akzeptierte Mechanismus der Spleißreaktion umfasst vier Reaktionsschritte (siehe Abbildung 1.5), nach deren Ablauf die beiden Exteine miteinander verknüpft sind und das Intein aus der Polypeptidkette entfernt ist.

Methylierung

Die Methylierung von Arg-Resten ist schon seit mehr als dreißig Jahren bekannt, hat aber erst in jüngster Zeit verstärkt Aufmerksamkeit auf sich gezogen (McBride & Silver, 2001). Drei Formen von Methylargininen konnten bislang in Eukaryoten nachgewiesen werden: N^G -Monomethylarginin (MMA), (asymmetrisches) N^GN^G -Dimethylarginin (aDMA) und (symmetrisches) N^GN^G -Dimethylarginin (sDMA). Häufig finden sich methylierte Arg-Reste bei Nukleinsäure-bindenden Proteinen wie beispielsweise bei den Histonen, dem Myelin-Basic-Protein, oder den spleißosomalen Proteinen SmD1 und SmD3 (Brahms et al., 2000). Die Argininmethylierung ist bei einer Reihe zellulärer Prozesse (z.B. Proteintransport, RNA-Bindung) von Bedeutung. Neben der Methylierung an Arg-Resten ist auch die Methylierung an Lys-Resten (Cavallius et al., 1993) und die Methylierung der C-terminalen Carboxygruppe (Zobel-Thropp et al., 2000) bekannt.

γ -Carboxylierung

Eine chemisch labile (Decarboxylierung) kovalente Modifikation ist die γ -Carboxylierung von Glutamat. Diese Modifikation spielt bei Proteinen, die an der Blutgerinnung beteiligt sind (z.B. Prothrombin) und bei Ca^{2+} -bindenden Proteinen, bei denen die zusätzliche Carboxygruppe zur Komplexierung des Metall-Ions eingesetzt wird, eine wichtige Rolle.

Desamidierung

An bestimmten Asparagin-Resten kommt es schon unter physiologischen Bedingungen zu einer spontanen Desamidierung. Dies ist beim Proteinabbau und der Proteinalterung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* von Relevanz. Durch die Desamidierung wird der genetisch codierte Asparagin-Rest in einen Aspartat-Rest umgewandelt. Die Reaktion verläuft nach dem sog. β -Aspartyl-Shift-Mechanismus über ein Succinimid-Intermediat (Geiger & Clarke, 1987). Die nicht-enzymatische Hydrolyse des Succinimids führt zur Bildung einer isoAsp/Asp-Mischung im Verhältnis 3:1. Zusätzlich unterliegt das Succinimid einer partiellen Racemisierung, so dass bei der Desamidierung von Asn-Resten letztendlich vier Produkte gebildet werden: L-Asp, D-Asp, L-isoAsp und D-isoAsp.

Methionin-Oxidation

Die Oxidation von Methionin zum entsprechenden Sulfoxid ist eine *in vitro* häufig zu beobachtende Reaktion. Es gibt aber auch Fälle, in denen diese kovalente Modifikation zur Regulation zellulärer Prozesse genutzt wird. Ein Beispiel hierfür ist die Modulation der Funktion eines spannungsabhängigen Kalium-Kanals durch die reversible Oxidation eines Methionin-Restes (Ciobra et al., 1997). Die Reduktion des oxidierten Methionins erfolgt dabei vermutlich durch Methionin-Sulfoxid-Reduktasen. Ein anderes Beispiel ist das Peptid Thymosin β 4, dessen entzündungshemmende Wirkung über die Oxidation eines spezifischen Methionin-Restes reguliert wird (Young et al., 1999).

Sulfatierung und Nitrierung von Tyrosin

Die Sulfatierung von Tyrosin ist die häufigste posttranslationale Modifikation dieser Aminosäure. Die Sulfatierung findet im Golgi-Apparat statt und ist bei verschiedenen zellulären Funktionen, wie etwa dem Proteintransport, von Bedeutung (Huttner, 1987). Eine andere Tyr-Modifikation ist die Nitrierung, die vor allem im Zusammenhang mit oxidativem Stress und Entzündungen beobachtet wird. Die Nitrierung der aromatischen Seitenkette des Tyrosins erfolgt wahrscheinlich durch Peroxynitrit, das *in vivo* aus Stickstoffmonoxid, einem intrazellulären Botenstoff, und Wasserstoffperoxid, das bei oxidativem Stress und bei Entzündungsreaktionen entsteht, gebildet wird (Beckman et al., 1990).

Neben den hier erwähnten Modifikationen gibt es noch eine Vielzahl weiterer co- und posttranslatinaler Modifikationen. Von diesen seien noch die 4-Hydroxyprolin- und 5-Hydroxylysin-Reste des Kollagens erwähnt, die ebenso wie Disulfidbrücken zwischen Cys-Resten (auch eine kovalente Proteinmodifikation) der strukturellen Stabilisierung von Proteinen dienen.

1.2 Biologische Massenspektrometrie

Biomoleküle wie Nukleinsäuren, Oligosaccharide, Peptide und Proteine waren der Massenspektrometrie lange Zeit nicht zugänglich, da geeignete Ionisationsmethoden fehlten, die in der Lage waren, diese nicht flüchtigen Verbindungen unzersetzt in die Gasphase zu transferieren. Erst mit der Einführung der beiden schonenden Ionisationsverfahren *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI) (Karas & Hillenkamp, 1988) und *Electrospray Ionization* (ESI) (Meng et al., 1988; Fenn et al., 1989) wurde die massenspektrometrische Analyse großer Biomoleküle möglich.

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)

Bei der Analyse mittels MALDI-MS wird der Analyt mit einem großen Überschuss an Matrix präpariert. Als Matrizes werden häufig aromatische Carbonsäuren wie 2,5-Dihydroxybenzoesäure (2,5-DHB), 4-Hydroxy- α -Cyanozimtsäure (HCCA) oder 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) verwendet (Glückmann & Karas, 1999), die im Wellenlängenbereich des verwendeten Lasers (meist N₂-Laser mit einer Wellenlänge von 337 nm) absorbieren. Zwei unterschiedliche Präparationsmethoden sind gebräuchlich, die sog. *Dried-Droplet*-Methode, bei der der Analyt mit der Matrix zunächst gemischt, und die Mischung dann auf dem MALDI-Target kristallisiert wird (Karas & Hillenkamp, 1988), und die sog. *Thin-Layer*-Methode, bei der zunächst eine dünne Schicht an Matrix auf das MALDI-Target kristallisiert wird, bevor im zweiten Schritt der Analyt aufgebracht wird (Vorm et al., 1994; Xiang & Beavis, 1994). Die Matrix erfüllt nach heutigem Verständnis mehrere Aufgaben: sie verdünnt und isoliert die Analyt-Moleküle voneinander, sie vermittelt die Energieabsorption, sie ermöglicht den Transfer des Analyten in die Gasphase, und sie ist an der Ionisierung des Analyten beteiligt.

Eine typische Eigenschaft der MALDI-Ionisation ist das Generieren einfach geladener Ionen (Karas et al., 2000). Dies hat den Vorteil, dass die MALDI-Spektren einfacher zu interpretieren sind als die entsprechenden ESI-Spektren. Nachteilig für die Analyse von Peptiden ist aber, dass bei der Fragmentierung einfach geladener Peptid-Ionen in der Regel weniger Sequenzinformation erhalten wird als bei der Fragmentierung höher geladener Peptid-Ionen. Weitere Vorteile von MALDI sind die hohe Empfindlichkeit, die gute Automatisierbarkeit und die relativ gute Toleranz gegenüber Salzverunreinigungen. Nachteilig ist, dass sich MALDI nicht direkt mit Trenntechniken wie der Flüssigkeitschromatographie (HPLC) oder der Kapillarelektrophorese (CE) kombinieren lässt.

Electrospray Ionization (ESI)

Bei der Elektrospray Ionisation wird die Analytlösung aus einer Kapillare in einem elektrischen Feld versprüht, das durch Anlegen einer Spannung zwischen der Kapillarspitze und dem Eingang des Massenspektrometers erzeugt wird. Das elektrische Feld bewirkt die Dispersion der Analytlösung in einen Sprühkegel (*Taylor-Cone*) aus kleinen geladenen Tröpfchen, die durch das Verdampfen des Lösungsmittels zu noch kleineren Tröpfchen zerfallen. Für den Übergang der solvatisierten Analytionen in die Gasphase werden zwei Modelle diskutiert: das *Ion-Evaporation-Modell* (Iribane & Thomson, 1976; Thomson & Iribane, 1979), bei dem der Übergang der Analytionen in die Gasphase durch Feld-Desorption der an der Oberfläche der kleinen Tröpfchen angereicherten Analytionen erklärt wird, und das *Charged-Residue-Modell* (Dole et al., 1968; Schmelzeisen-Redecker et al., 1989), das von der Bildung sehr kleiner Tröpfchen mit einem Durchmesser von etwa 10 nm aus-

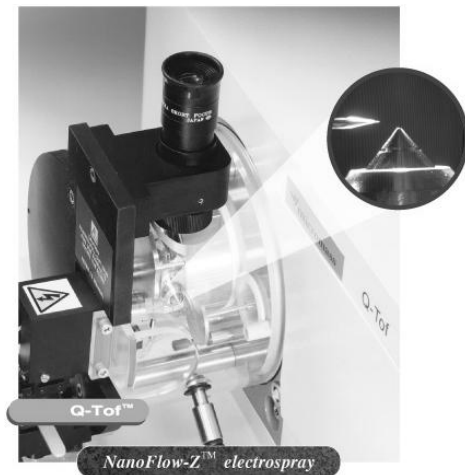


Abbildung 1.6: NanoESI-Quelle des Q-TOFs (Micromass). Die verwendeten Kapillaren haben an der Spitze einen Innendurchmesser von etwa 1-5 μm und sind mit einer semitransparenten Schicht aus Gold bedampft. Die Flußrate durch die Kapillare beträgt ca. 20 nL/min. Damit ist die Analyse von subpicomolaren Mengen an Peptiden in Volumina von weniger als 1 μL möglich.

geht, aus welchen die Analytationen nach dem Verdunsten des Lösungsmittels entstehen. Durch die Verringerung des Kapillardurchmessers lässt sich die Größe der initialen Tropfen reduzieren, was zu einer besseren Ionisationsausbeute führt (Wilm & Mann, 1994; Wilm & Mann, 1996). Beim sog. nanoESI (siehe Abbildung 1.6) hat die Spitze der Kapillare einen Innendurchmesser von etwa 1-5 μm und die Flußrate beträgt ca. 20 nL/min. Damit ist die Analyse von subpicomolaren Mengen an Peptiden in Volumina von weniger als 1 μL möglich.

Typisch für ESI-Spektren ist das Auftreten mehrfach geladener Ionen, was die Kopplung einer ESI-Quelle an einen Massenanalysator mit einem begrenzten m/z -Bereich (z.B. Quadrupol) ermöglicht. ESI erlaubt im Gegensatz zu MALDI die direkte Kopplung von Trenntechniken wie HPLC oder CE. Die ES-Ionisation ist allerdings sehr empfindlich gegenüber Salzen oder Detergenzien.

Kollisionsinduzierte Fragmentierung von Peptiden

Die am weitesten verbreitete Methode zur Fragmentierung von Peptiden ist die sog. Niederenergie-Stoßaktivierung (*low energy CID*) mit Kollisionsenergien unterhalb von 250 eV (Shukla & Futrell, 2000). Peptide werden in aller Regel als einfach oder mehrfach protonierte Moleküle analysiert. Die Fragmentionen-Spektren protonierter Peptide sind in erster Linie durch sog. b- und y-Ionen, also Fragmentionen, die durch eine Spaltung der Amidbindungen entstehen, dominiert. Die heute verwendete Nomenklatur (siehe Abbildung 1.7) für die Fragmentionen bei Peptiden wurde ursprünglich von Roepstorff und Fohlmann vorgeschlagen (Roepstorff & Fohlmann, 1984) und später durch Biemann modifiziert (Biemann, 1988). Für die Bildung der b- und y-Ionen wurde 1994 von Arnott et al. der sog. Oxazolone-Mechanismus vorgeschlagen (Arnott et al., 1994; O'Hair, 2000; Schlosser & Lehmann, 2000; Polce et al., 2000; Wysocki et al., 2000), der auf der Modell-

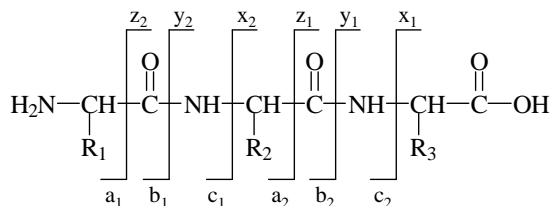


Abbildung 1.7: Nomenklatur für die Fragmentionen von Peptiden nach Biemann (Biemann, 1988). Bei kollisionsinduzierter Fragmentierung sind vor allem a-, b- und y-Ionen zu beobachten.

vorstellung des „mobilen Protons“ basiert. Die reaktive Konfiguration eines protonierten Peptids ist diesem Fragmentierungsmodell zufolge ein an einem Amidstickstoff protoniertes Peptid (siehe Abbildung 1.8). Von dieser Konfiguration ausgehend kann der nukleophile Angriff des Carbonylsauerstoffs der N-terminal benachbarten Aminosäure erfolgen, der zur Bildung einer fünfgliedrigen Zwischenstufe führt. Die nachfolgende Spaltung der C-N-Bindung ohne Protontransfer führt zur Bildung eines b-Ions mit Oxazolion-Struktur. Erfolgt ein Protontransfer auf den Amidstickstoff, so wird ein y-Ion gebildet. Die auf diese Weise gebildeten b- und y-Ionen zeigen häufig Neutralverluste kleiner Moleküle wie CO (Bildung von a-Ionen), H₂O oder NH₃.

Tandem-Massenspektrometer

Es gibt drei gebräuchliche Arten sog. *Tandem-in-Space*-Massenspektrometer, bei denen Quadrupol- (Q) und *Time-of-Flight*-Analysatoren (TOF) miteinander kombiniert werden: Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer (Yost & Enke, 1979), Quadrupol-TOF-Massenspektrometer (Morris et al., 1996; Morris et al., 1997; Chernushevich et al., 1999) und sog. TOF/TOF-Massenspektrometer (Medzihradszky et al., 2000). Bei allen drei Spektrometern befindet sich zwischen den beiden Massenanalysatoren eine Stoßkammer, die für Tandem-MS-Experimente mit Stoßgas (meist Argon) gefüllt werden kann. Bei Tripel-Quadrupol-Spektrometern befindet sich vor und nach der Stoßkammer ein Quadrupol-Massenanalysator (siehe Abbildung 1.9). Mit einer solchen Anordnung lassen sich alle Arten von Tandem-MS-Experimenten durchführen: Fragmentionen-Scan, Vorläuferionen-Scan, Neutralverlust-Scan und *Selective-Reaction-Monitoring* (de Hoffmann, 1996). Nachteilig bei Tripel-Quadrupol-Geräten ist die niedrige Auflösung und die schlechte Massenpräzision der Quadrupol-Analysatoren. Quadrupol-TOF-Geräte bieten durch die Kombination mit einem Flugzeit-Analysator (siehe Abbildung 1.10) ein wesentlich höheres Auflösungsvermögen (> 20 000 bei Geräten der neuesten Generation) und eine bessere Massenpräzision (ca. 5 ppm bei interner Kalibrierung). Seit kurzem ist auch die Geräte-

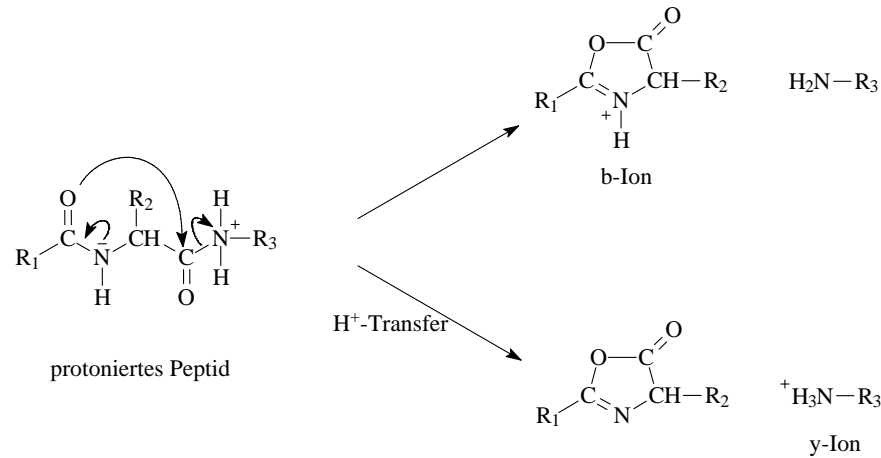


Abbildung 1.8: Postulierter Fragmentierungs-Mechanismus für die Bildung von b- und y-Ionen nach Arnott et al. (Arnott et al., 1994). Die Fragmentierung wird demnach durch einen nukleophilen Angriff des Carbonylsauerstoffs der N-terminal benachbarten Aminosäure induziert. Die nachfolgende Spaltung der C-N-Bindung ohne Protontransfer führt zur Bildung eines b-Ions mit Oxazolion-Struktur. Erfolgt ein Protontransfer auf den Amidstickstoff, so wird ein y-Ion gebildet.

Kombination mit zwei Flugzeit-Analysatoren (TOF/TOF) kommerziell erhältlich.

Im Gegensatz zu den *Tandem-in-Space*-Spektrometern, die aus zwei räumlich getrennten Analysatoren bestehen, besitzen die sog. *Tandem-in-Time*-Spektrometer nur einen Massenanalysator, entweder eine Quadrupol-Ionenfalle (Paul-Falle) (Paul & Raether, 1955; Paul, 1990) oder, im Falle von Fourier-Transform-Ionen-Cyclotron-Resonanz-Massenspektrometern (FTICR-MS), eine sog. Penning-Falle (Comisarow & Marshall, 1974; Marshall et al., 1998). Ionenfallen ermöglichen die Durchführung von MSⁿ-Experimenten, wobei die Anzahl der Fragmentierungsstufen prinzipiell nur durch die Intensität der Fragmentionen limitiert wird. Die Fragmentierung in Quadrupol-Ionenfallen erfolgt in aller Regel mittels kollisionsinduzierter Fragmentierung (Stoßgas Helium). Aufgrund der hohen Ansprüche an das Vakuum (< 10⁻¹⁰ Pa) ist die Verwendung von Stoßgas für FTICR-Geräte problematischer. Hier werden häufig alternative Fragmentierungstechniken wie die Infrarot-Multiphotonen-Dissoziation (IRMPD) (Little et al., 1994; Flora & Muddiman, 2001) oder die *Electron-Capture-Dissociation* (ECD) (Zubarev et al., 1998) eingesetzt. FTICR-Massenspektrometer zeichnen sich durch eine besonders gute Massenpräzision (< 1 ppm) und ein extrem hohes maximales Auflösungsvermögen (> 100 000) (He et al., 2001) aus.

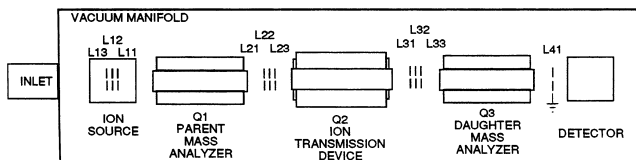


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung eines Tripel-Quadrupol-Massenspektrometers. Vor und hinter der Stoßkammer befindet sich jeweils ein Quadrupol. Diese Anordnung erlaubt alle Arten von Tandem-MS-Experimenten: Fragmentationen-Scan, Vorläuferionen-Scan, Neutralverlust-Scan und *Selective-Reaction-Monitoring*.

Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie und Proteindatenbanken

Proteine lassen sich alleine anhand von Peptidmassen ihrer proteolytischen Fragmente in einer Proteindatenbank identifizieren (Mann et al., 1993; Yates et al., 1993; James et al., 1993; Pappin et al., 1993). Bei diesem sog. *Peptide-Mass-Fingerprinting* werden die experimentell bestimmten Peptidmassen mit den Massen der theoretisch zu erwartenden Peptidfragmente (*in silico-Verdau*) von Proteinen verglichen. Für die Identifizierung eines Proteins nach dieser Methode werden etwa 5 bis 10 Peptide benötigt. Wird für die Datenbanksuche zusätzlich zur Peptidmasse noch Sequenzinformation aus Fragmentationenspektren verwendet, dann ist in der Regel ein Peptid für die Identifizierung eines Proteins ausreichend. Für die Proteinidentifizierung mittels Sequenzdaten gibt es zwei unterschiedliche Ansätze: i) Die Verwendung uninterpretierter Fragmentationenspektren (Eng et al., 1994; Perkins et al., 1999) und ii) die sog. *Sequence-Tag-Methode* (Mann & Wilm, 1994). Bei der Verwendung uninterpretierter Fragmentationenspektren werden die experimentellen MS/MS-Daten mit den theoretisch zu erwartenden Fragmentationen eines Peptids verglichen. Diese Methode lässt sich ohne manuelle Spektren-Interpretation durchführen und erlaubt damit die Bearbeitung einer großen Zahl an Fragmentationenspektren (z.B. Daten aus einem LC-MS/MS-Lauf) in kurzer Zeit. Bei der *Sequence-Tag-Methode* wird eine manuell ermittelte Teilsequenz eines Peptids für die Suche in einer Proteindatenbank verwendet. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass sie auch die fehlertolerante Identifizierung von Peptiden erlaubt, was die Identifizierung von kovalent modifizierten Peptiden ermöglicht. Ein neuerer Ansatz nutzt die anhand ihrer Präzisionsmasse identifizierbaren Dipeptidfragmente zur Identifizierung von Peptiden und Proteinen (*Patchwork-Sequencing*) (Schlosser & Lehmann, 2001; Nielsen et al., 2002; Schlosser & Lehmann, 2002).

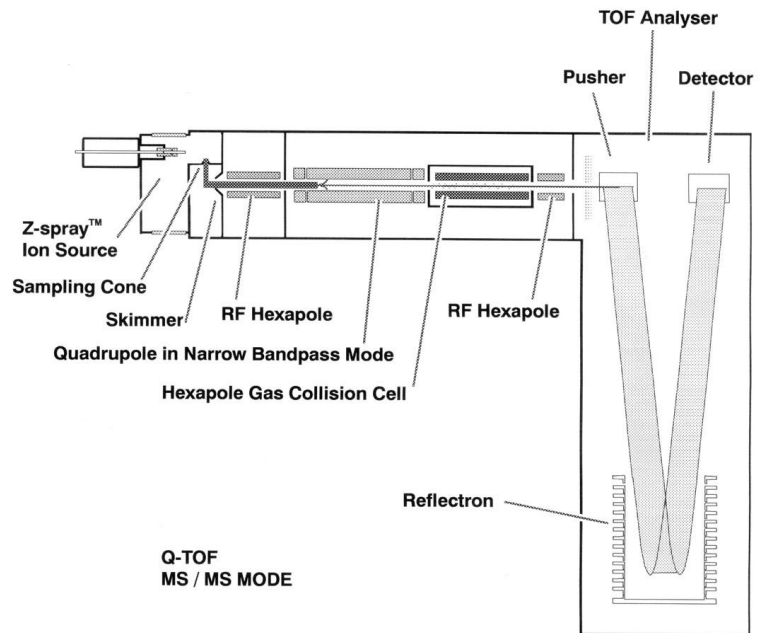


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung eines Quadrupol-TOF-Massenspektrometers. Ein Quadrupol-TOF-Spektrometer bietet durch die Kombination mit einem Flugzeit-Analysator ein wesentlich höheres Auflösungsvermögen ($> 20\,000$ bei Geräten der neuesten Generation) und eine bessere Massenpräzision (ca. 5 ppm bei interner Kalibrierung) als ein Tripel-Quadrupol-Spektrometer.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel stammen, soweit nicht anders angegeben, von Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Fluka (Buchs, Schweiz) und hatten den Reinheitsgrad *pro analysi* bzw. *gradient grade*.

2.2 Peptidsynthese

Die Synthese von Peptiden und Phosphopeptiden wurde von Dr. R. Pipkorn (Zentrale Peptidsyntheseinheit, DKFZ) durchgeführt. Alle Peptide wurden mittels Festphasensynthese (Merrifield, 1963) nach der Fmoc-Strategie (Fields & Noble, 1990) dargestellt.

2.3 Präparation der katalytischen Untereinheit der PKA

Die Präparation der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) erfolgte mittels Affinitäts-Chromatographie unter Einsatz des sog. PKA-Inhibitor-Peptids (PKIP) (Olsen & Uhler, 1989). Mit dieser Methode wurde zum einen das rekombinante, überexprimierte Protein aus *E. coli* isoliert, zum anderen das native Enzym aus Rinderherz.

Rekombinante PKA

Die Transformation und Anzucht der *E. coli*-Zellen, sowie die Präparation des PKIP-Affinitätsgels (Affi-Gel 10, BioRad, München, Deutschland) wurde von Norbert König (Abteilung Pathochemie, DKFZ) durchgeführt. Die *E. coli*-Suspension mit den PKA-überexprimierenden Zellen wurde 20 min bei 5 000 rpm in einem H4000-Rotor (Sorvall, Bad Homburg, Deutschland) bei 4 °C zentrifugiert, und der Überstand wurde abdekantiert. Das Pellet wurde zweimal mit Lysepuffer (30 mM MES pH 6.5, 50 mM KCl, 1 mM

EDTA, 1 mM DTT) gewaschen. Der Aufschluss der Zellen erfolgte in einer French-Press bei 2 000 psi. Die aufgeschlossenen Zellen wurden bei 30 000 rpm in einem 45 TI-Rotor (Ultrazentrifuge: L8-55, Beckman, München, Deutschland) für eine Stunde ultrazentrifugiert. Der Überstand (60 mL) wurde abdekantiert und mit 0.4 mL 0.5 M ATP (Dinatriumsalz), 180 μ L 1 M MgCl₂ und 10 mL in TMN 50-Puffer (50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 20 mM Tris pH 7.4) suspendiertem PKIP-Affinitätsgel versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 4 °C wurde das PKIP-Gel bei 3 500 rpm in einem RC3B-Rotor abzentrifugiert. Das PKIP-Gel wurde zweimal mit TMN 50 (in Gegenwart von 0.4 mM ATP) gewaschen und anschließend in eine Säule überführt. Zur Elution unspezifisch gebundener Proteine wurde mit 50 mL TMN 50 (in Gegenwart von 0.4 mM ATP) und mit 50 mL TMN 250 (in Gegenwart von 0.4 mM ATP) gewaschen. Die Elution der katalytischen Untereinheit der PKA erfolgte mit 10 mL Arginin-Puffer (200 mM Arginin, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris pH 7.4). Das Eluat wurde mittels Ultrafiltration (Centricon 30, Millipore, Bedford, MA, USA) aufkonzentriert, und die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford bestimmt (Bradford, 1976).

PKA aus Rinderherz

100 g in kleine Stücke geschnittenes Rinderherz wurde in 150 mL Lyse-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF) dreimal 2 min (Waring Blendor, Snijders Scientific, Tilburg, Holland) homogenisiert, zwischendurch wurde jeweils 5 min auf Eis gekühlt. Das Homogenat wurde dann zunächst 15 min bei 11 000 rpm (4 °C) im GSA-Rotor zentrifugiert und anschließend 45 min bei 30 000 rpm (4 °C) ultrazentrifugiert. Der Überstand (120 mL) wurde abdekantiert und mit 0.8 mL 0.5 M ATP (Dinatriumsalz), 360 μ L 1 M MgCl₂ und 20 mL in TMN 50-Puffer (50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 20 mM Tris pH 7.4) suspendiertem PKIP-Affinitätsgel versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 4 °C wurde das PKIP-Gel bei 3 500 rpm in einem RC3B-Rotor abzentrifugiert und in eine Säule überführt. Zur Elution unspezifisch gebundener Proteine wurde mit 100 mL TMN 50 (in Gegenwart von 0.4 mM ATP) und mit 100 mL TMN 250 (in Gegenwart von 0.4 mM ATP) gewaschen. Die Elution der katalytischen Untereinheit der PKA erfolgte mit 15 mL Arginin-Puffer (200 mM Arginin, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris pH 7.4). Das Eluat wurde mittels Ultrafiltration (Centricon 30, Millipore, Bedford, MA, USA) aufkonzentriert, und die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford bestimmt (Bradford, 1976).

Kationentauscher-Chromatographie

Sowohl die rekombinante als auch die aus Rinderherz isolierte katalytische Untereinheit der PKA ist hinsichtlich ihrer kovalenten Modifikationen heterogen, und lässt sich

mittels Kationentauscher-Chromatographie weiter auftrennen. Zu diesem Zweck wurde eine Smart-HPLC von Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) mit einer Mini-S Kationentauscher-Säule (Mini S PC3.2/3, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) eingesetzt. Das Elutionssystem bestand aus Puffer A mit 20 mM BisTrisPropan pH 8.6 und aus Puffer B mit 20 mM BisTrisPropan pH 8.6, 1 M LiCl. Es wurde ein linearer Gradient von 0 auf 35 % Puffer B in 12 min gefahren (konstante Flussrate von 300 $\mu\text{L}/\text{min}$). Die Probenschleife hatte ein Volumen von 100 μL .

2.4 Gelelektrophorese

Die eindimensionale SDS-Gelelektrophorese wurde mit der Apparatur XCell *Sure Lock* Mini-Cell (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt. Die hierfür verwendeten Gele (NuPAGE, 4-12 % Bis-Tris Gele) hatten eine Größe von 8.0 x 8.0 cm und eine Dicke von 1.0 mm. Die Gelelektrophorese wurde entsprechend den Herstellerangaben folgendermaßen durchgeführt: Die Proteinlösung wurde mit NuPAGE sample buffer (vierfach konzentrierter sample buffer: 4.0 g Glycerin, 0.682 g Tris Base, 0.660 g Tris-HCl, 0.8 g LDS, 0.006 g EDTA, 0.75 mL 1 % Serva Blue G250, 0.25 mL Phenolrot, ad 10 mL Wasser) versetzt und nach Zugabe von DTT (Endkonzentration: 50 mM) für 10 min auf 70 °C erhitzt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 200 V durchgeführt. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele mit 0.2%iger Coomassie-Lösung (SERVA Blau R, Serva, Heidelberg, Deutschland) in 40 % 2-Propanol/10 % Essigsäure für 20 min gefärbt, und mit 40 % 2-Propanol/10 % Essigsäure über Nacht entfärbt. Zur Aufbewahrung wurden die Gele mit 1%iger Essigsäure in PE-Folie eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

2.5 Enzymatische und chemische Spaltung von Proteinen

2.5.1 Bromcyanspaltung

Zur Durchführung der Bromcyanspaltung wurde das entsprechende Protein in 40 mM HCl/8 M Harnstoff gelöst. Das Cyanogenbromid wurde in Acetonitril gelöst und in 10 000fachen molaren Überschuss zum Protein eingesetzt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

2.5.2 Enzymatische Spaltung

Zum Verdau wurden die Proteine im entsprechenden Puffer gelöst und mit einem Verhältnis von 1:50 bis 1:5 (w/w) mit Protease bei 37 °C über Nacht inkubiert. In Tabelle 2.1

Tabelle 2.1: Pufferbedingungen für Proteasen

Protease	Puffer
Trypsin (modified)	0.1 M NH_4HCO_3 , pH 8.0
Chymotrypsin	0.1 M Tris-HCl, 10 mM CaCl_2 , pH 7.8
Endoprotease Lys-C	25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.5
Endoprotease Arg-C	50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl_2 , 5 mM EDTA, pH 8.0
Endoprotease Asp-N	50 mM Tris-HCl, pH 8.0
Elastase	0.1 M NH_4HCO_3 , pH 8.0

sind für alle eingesetzten Proteasen die verwendeten Pufferbedingungen aufgelistet. Alle verwendeten Enzyme stammen von Roche (Mannheim, Deutschland) und hatten, mit Ausnahme von Elastase, die Reinheitsstufe *sequencing grade*.

2.5.3 In-Gel-Verdau

Zum in-Gel-Verdau von Proteinen wurde die entsprechende Coomassie-gefärbte Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in kleine Stücke zerteilt. Diese wurden in ein 200 μL -Reaktionsgefäß (Multi UltraTubes, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) überführt, mit 100 μL 30 % Acetonitril/0.1 M NH_4HCO_3 entfärbt, zweimal mit 100 μL Wasser gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet. Zur Reduktion von Disulfidbrücken wurden die getrockneten Gelstücke mit 10 mM DTT/0.1 M NH_4HCO_3 bei 57 °C für 45 min inkubiert. Nach dem Entfernen der Lösung wurden die Gelstücke zweimal mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Zur Alkylierung der reduzierten Cysteine wurden die Gelstücke mit 50 μL 55 mM Iodacetamid (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in 0.1 M NH_4HCO_3 für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Iodacetamidlösung wurde entfernt, die Gelstücke wurden zweimal mit 100 μL Wasser gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet. Zur enzymatischen Spaltung wurden die getrockneten Gelstücke mit 10 μL einer Proteaselösung (0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) und mit ca. 30 μL Puffer (vgl. Tabelle 2.1) bei 37 °C über Nacht inkubiert. Der Überstand wurde abpipettiert, die Gelstücke zweimal mit ca. 10 μL 5%iger Ameisensäure extrahiert, und die Extraktionslösungen wurden mit dem Überstand vereinigt.

2.6 Entsalzung

Entsalzung intakter Proteine

Vor der Bestimmung der Molekülmasse intakter Proteine wurden diese mit Hilfe von C₄-ZipTips (Millipore, Bedford, MA, USA) entsalzt. Die Umkehrphase wurde dreimal mit 10 μ L 50 % 2-Propanol/50 % Ameisensäure konditioniert und dreimal mit 10 μ L 50%iger Ameisensäure äquilibriert. Das an die Umkehrphase gebundene Protein wurde dreimal mit 10 μ L 50%iger Ameisensäure gewaschen. Die Proteinelution erfolgte mit ca. 2 μ L 50 % 2-Propanol/50 % Ameisensäure.

Entsalzung von Peptidgemischen

Die Entsalzung von Peptidgemischen wurde mit C₁₈-ZipTips (Millipore, Bedford, MA, USA) durchgeführt. Die Konditionierung der Umkehrphase erfolgte dreimal mit 10 μ L 50 % Acetonitril/2 % Ameisensäure, die Äquilibrierung dreimal mit 10 μ L 2%iger Ameisensäure. Die an die C₁₈-Phase gebundenen Peptide wurden dreimal mit 10 μ L 2%iger Ameisensäure gewaschen und mit ca. 2 μ L 50 % Acetonitril/2 % Ameisensäure eluiert. Die ZipTip-Eluat wurden mit Hilfe eines Microloaders (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in eine nanoESI-Kapillare überführt.

2.7 Metallaffinitätschromatographie

Die zur Anreicherung von Phosphopeptiden eingesetzte Metallaffinitätschromatographie wurde in selbst präparierten Mikrosäulen durchgeführt. Hierfür wurde eine 10 μ L-Pipettenspitze (MiniFlex Round Tips, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) mit einer Glasfaserfritte (Grom, Herrenberg-Kayh, Deutschland) versehen und mit etwa 5 μ L Chromatographiematerial (Poros MC, PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA), das zuvor in 200 mM Ga(NO₃)₃-Lösung aufgeschlämmt wurde, gefüllt. Die gepackte Mikrosäule wurde mit 100 μ L 1 % Essigsäure/10 % Acetonitril und mit 100 μ L 0.1 % Essigsäure/10 % Acetonitril äquilibriert. Das in etwa 20 μ L 20%iger Essigsäure gelöste Peptidgemisch wurde langsam über die IMAC-Säule gegeben, mit 100 μ L 0.1 % Essigsäure/10 % Acetonitril gewaschen, und mit 20 μ L 200 mM KH₂PO₄ (pH 8.0) eluiert. Anschließend wurde das Eluat wie oben beschrieben mit C₁₈-ZipTips entsalzt.

2.8 Präparation der nanoESI-Kapillaren

Die verwendeten nanoESI-Kapillaren wurden aus Borsilikat-Kapillaren (GC120F-10, Harvard Apparatus LTD, Kent, UK) mit Hilfe eines Mikrokapillaren-Pullers (Model P-87,

Sutter Instrument Co, Novato, USA) hergestellt. Die Kapillaren wurden mit einer Sputter-Einheit (Sputter Coater SCD 005, BAL-TEC AG, Balzers, Fürstentum Liechtenstein) für 6 min mit Gold bedampft.

2.9 Massenspektrometer

Die nanoESI-Experimente wurden an einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer (TSQ 7000, Finnigan, San Jose, CA, USA) und an einem Hybrid-Quadrupol-TOF-Massenspektrometer (Q-TOF 2, Micromass, Manchester, UK) durchgeführt. Zur Kalibrierung des TSQ 7000 wurde apo-Myoglobin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) verwendet, als Kollisionsgas wurde Argon eingesetzt (2.5 mTorr), die Spannung an der nanoESI-Nadel betrug zwischen 600 und 1000 V. Die verwendete Software für das TSQ 7000 war ISIS 8.6. Das Q-TOF 2 wurde mit 20 mM Phosphorsäure in 50 % 2-Propanol kalibriert, Argon wurde als Kollisionsgas eingesetzt, die Spannung an der nanoESI-Nadel betrug 1000-1200 V, und die eingesetzte Software war MassLynx 3.5.

Tabelle 2.2: Zusammenstellung der für die automatisch generierten Fragmentionen-Spektren verwendeten Kollisionsspannungen (KS).

m/z	KS 1 (V)	KS 2 (V)	KS 3 (V)	KS 4 (V)	KS 5 (V)
300 - 400	18	20	21	22	45
400 - 500	20	22	23	25	48
500 - 600	23	24	26	27	49
600 - 700	26	27	28	29	50
700 - 800	28	29	30	31	51
800 - 900	31	32	33	34	52
900 - 1000	34	35	36	38	54
1000 - 1200	36	37	38	40	55

Die Analyse von Peptidgemischen, die mittels IMAC angereichert wurden, erfolgte unter Verwendung des automatischen *MS-to-MS/MS-Switching* (siehe Kapitel 1.3). Die dabei verwendeten Kollisionsspannungen sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

2.10 Datenbanksuche und Datenanalyse

Zur Proteinidentifizierung wurde das Programm Mascot von Matrix Science verwendet (www.matrixscience.com). Mascot erlaubt die Verwendung uninterpretierter MS/MS-Daten im PKL-Dateiformat, das von der Micromass-Software MassLynx verwendet wird. Die Analyse kovalenter Proteinmodifikationen wurde mit Hilfe des Programms Sherpa (www.hairyfatguy.com/Sherpa/Info.html), der unter mbcf.dfc.harvard.edu/docs/DeltaMass.html (Delta Mass Version 2.1) erhältlichen Massenliste und dem Internet-Tool Glypeps (www.dkfz-heidelberg.de/spec/glypeps) durchgeführt. Bei der Darstellung von Massenspektren wurden zur übersichtlicheren Darstellung der experimentellen Parameter Piktogramme verwendet (Lehmann, 1997).

Kapitel 3

Analyse der Proteinphosphorylierung

3.1 Einleitung

Die auf der Massenspektrometrie basierenden Methoden zur Analyse der Proteinphosphorylierung haben im Laufe der letzten Jahre, seit etwa 1993, zunehmend an Bedeutung gewonnen (McLachlin & Chait, 2001). Vor ihrer Einführung war das Markieren mit ^{32}P (alternativ auch mit ^{33}P) z.B. durch *in vitro*-Inkubation mit radioaktivem $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ die Grundlage für verschiedene Methoden zur Lokalisierung von Phosphorylierungsstellen (Yan et al., 1998; van der Geer et al., 1999; Haystead & Garrison, 1999). Ein grundsätzlicher Nachteil einer *in-vitro*-Phosphorylierung ist, dass nur Proteine analysiert werden können, die sich nachträglich markieren lassen. Phosphorylierungsstellen, die vor der radioaktiven Markierung schon phosphoryliert vorliegen, werden bei einer *in-vitro*-Phosphorylierung nicht erfasst. Für ein *in-vivo*-Phosphorylierungs-Experiment ist eine hohe Konzentration an radioaktiv markiertem ATP erforderlich. Dies bedingt zum einen einen großen experimentellen Aufwand (Strahlenschutz), zum anderen ist die Aussagekraft eines solchen Experiments nur begrenzt, da die hohe Strahlenbelastung zu einer Veränderung der Zellfunktionen und damit auch zu einer Veränderung des Phosphorylierungsstatus der Zelle führen kann. Da bei den MS-basierenden Methoden keine Markierung erforderlich ist, kann mit ihrer Hilfe der Phosphorylierungsstatus der Zelle grundsätzlich besser erfasst werden. Die Tandem-Massenspektrometrie bietet darüber hinaus die Möglichkeit zur exakten Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle innerhalb eines Phosphopeptids, und dies sogar ohne Vorkenntnis der Proteinsequenz. Das ist bei anderen Methoden nur mit Referenzsubstanzen oder mittels Edman-Sequenzierung möglich.

In Abbildung 3.1 ist ein allgemeines Schema für eine massenspektrometrische Analyse der Proteinphosphorylierung dargestellt. Es ist bislang nicht möglich die Lokalisierung von Phosphorylierungsstellen auf der Ebene des intakten Proteins durchzuführen, auch wenn eine neu entwickelte Fragmentierungstechnik, die sog. *Electron Capture Dissociation* (Zubarev et al., 1998), dies zukünftig ermöglichen könnte (Stensballe et al., 2000; Shi et al., 2001). Etablierte Fragmentierungstechniken, wie etwa die kollisionsinduzierte Fragmentierung, liefern nur bei Peptiden bis zu einer Größe von etwa 20 bis 30 Aminosäuren informative Fragmentionen-Spektren und erfordern deshalb die Spaltung des zu analysierenden Phosphoproteins. Das dabei generierte Peptidgemisch ist aber in der Regel so komplex, dass eine vollständige Charakterisierung aller Peptide durch Fragmentionenspektren, auch mittels LC-MS/MS, nicht möglich ist. Um die Fragmentionen-Analyse auf die Phosphopeptide beschränken zu können, müssen diese von den nicht phosphorylierten Peptiden unterschieden werden. Hierfür gibt es im Wesentlichen zwei Ansätze: i) die selektive Detektion von Phosphopeptiden, meist basierend auf Phosphopeptid-spezifischen Fragmentierungsreaktionen, und ii) die selektive Anreicherung von Phosphopeptiden aufgrund Phosphopeptid-spezifischer Affinitätseigenschaften.

3.1.1 Selektive Detektion von Phosphopeptiden

Phosphopeptid-spezifische Fragmentierungsreaktionen

Phosphopeptide zeigen sowohl bei laserinduzierter als auch bei kollisionsinduzierter Fragmentierung spezifische Reaktionen, die zu ihrer selektiven Detektion genutzt werden können. Die wichtigsten dieser Fragmentierungsreaktionen sind in Abbildung 3.2 zusammengefasst. Im Positiv-Ionen-Modus zeigen Ser/Thr-phosphorylierte Peptide einen leicht zu induzierenden Neutralverlust von Phosphorsäure. Die Abspaltung der Phosphorsäure verläuft dabei über einen sechsgliedrigen Übergangszustand (Tholey et al., 1998). Entsprechend der Tatsache, dass die Ausbildung dieses Übergangszustandes im Falle von pTyr nicht möglich ist, wird bei Tyr-phosphorylierten Peptiden auch keine Phosphorsäureabspaltung beobachtet. Stattdessen wird im Falle von Peptiden mit pTyr bei höheren Kollisionsspannungen das Phosphotyrosin-Immonium-Ion (m/z 216) gebildet (Annan & Carr, 1996; Lehmann, 1999). Im Negativ-Ionen-Modus führt die Fragmentierung von Ser/Thr-phosphorylierten Peptiden zur Bildung von Dihydrogenphosphat (m/z 97). Die Bildung des PO_3^- -Ions (m/z 79) ist sowohl bei Ser/Thr- als auch bei Tyr-phosphorylierten Peptiden zu beobachten (Huddleston et al., 1993).

Die beschriebenen Fragmentierungsreaktionen lassen sich mit unterschiedlichen Massenspektrometern zur selektiven Phosphopeptid-Detektion nutzen. Mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer lassen sich Phosphopeptide im Reflektor-Modus durch das Auf-

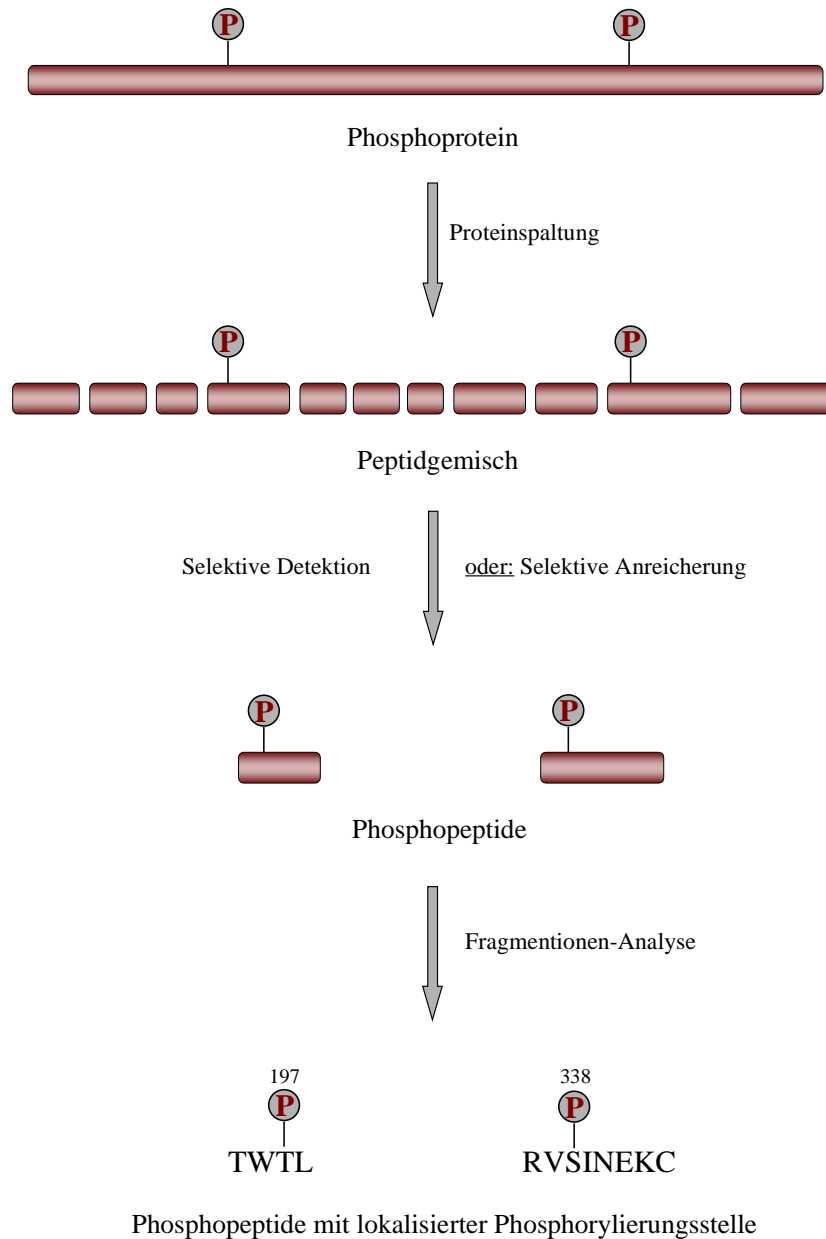


Abbildung 3.1: Strategie einer massenspektrometrischen Analyse der Proteinphosphorylierung. Im ersten Schritt der Analyse wird das Phosphoprotein chemisch oder enzymatisch gespalten. Um die im resultierenden Peptidgemisch enthaltenen Phosphopeptide gezielt analysieren zu können, werden diese im zweiten Analysenschritt entweder unter Ausnutzung Phosphopeptid-spezifischer Fragmentierungsreaktionen selektiv detektiert (z.B. Neutralverlust-Scan oder Vorläuferionen-Scan) oder mittels Affinitätschromatographie (z.B. IMAC oder Antikörper) selektiv angereichert. Die exakte Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle erfolgt im dritten Schritt mittels Fragmentionen-Analyse (z.B. kollisioninduzierte oder laserinduzierte Fragmentierung) der Phosphopeptide.

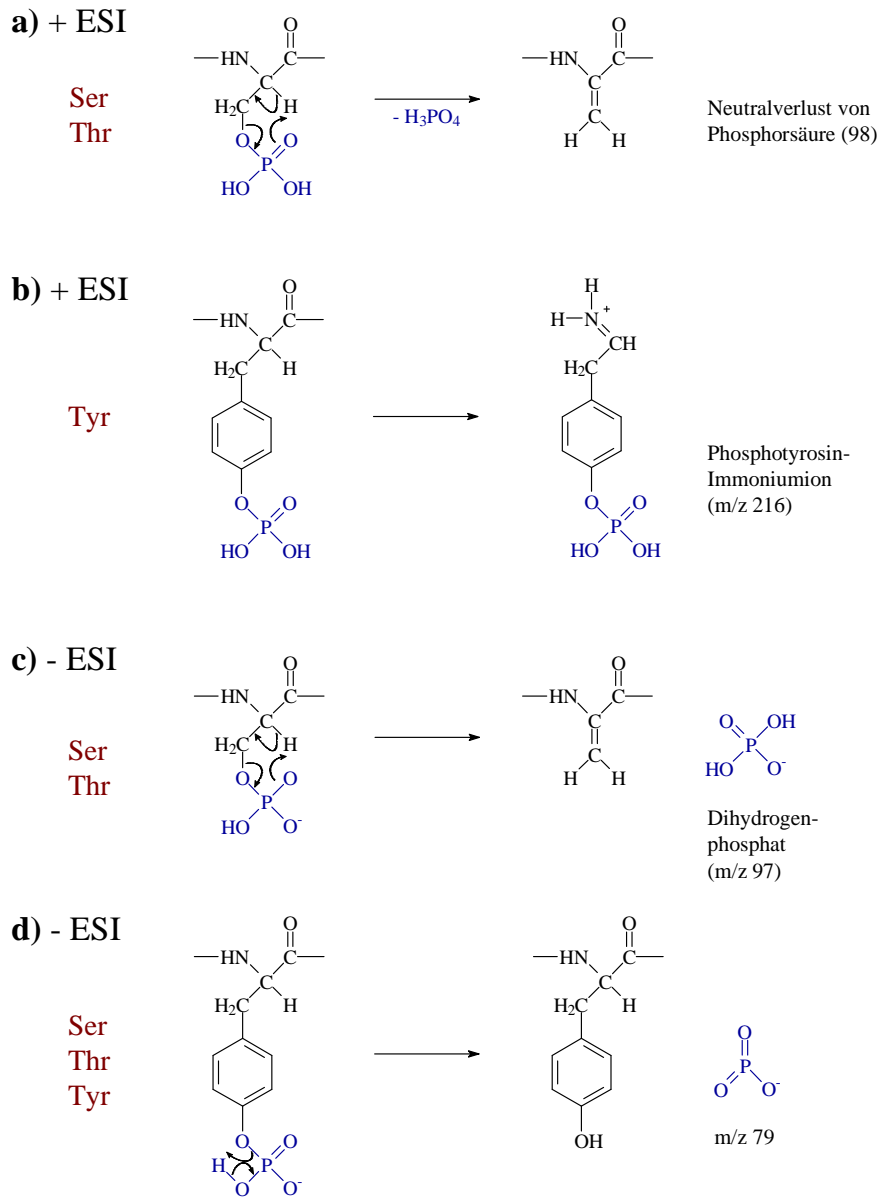


Abbildung 3.2: Wichtige Fragmentierungsmechanismen von Ser/Thr- und Tyr-phosphorylierten Peptiden. a) Neutralverlust von H_3PO_4 bei Ser/Thr-phosphorylierten Peptiden im Positiv-Ionen-Modus; b) Bildung des Phosphotyrosin-Immoniumions im Positiv-Ionen-Modus; c) Bildung von Dihydrogenphosphat bei Ser/Thr-phosphorylierten Peptiden im Negativ-Ionen-Modus; d) Bildung des PO_3^- -Ions bei Ser/Thr- und Tyr-phosphorylierten Peptiden im Negativ-Ionen-Modus.

treten von Peaks metastabiler Ionen erkennen (Annan & Carr, 1996; Schnölzer & Lehmann, 1997). Da die mittlere Lebensdauer der Phosphopeptid-Ionen in der gleichen Größenordnung wie die Flugzeit der Ionen (ca. 10 - 100 μ s) liegt, findet die Abspaltung von HPO_3 oder H_3PO_4 mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit in der feldfreien Region zwischen Ionenquelle und Detektor statt. Diese sog. metastabilen Zerfälle führen im Reflektor-Modus zum Auftreten von Satelliten-Peaks bei m/z -Werten, die höher liegen als die erwarteten.

Vorläuferionen-Scan

Zwei Scan-Techniken, die sich zur selektiven Detektion von Phosphopeptiden besonders eignen, der sog. Vorläuferionen-Scan und der sog. Neutralverlust-Scan, lassen sich instrumentell nur mit einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer durchführen. Bei einem Vorläuferionen-Scan für das Phosphopeptid-spezifische Fragmentation PO_3^- (Carr et al., 1996; Wilm et al., 1996) wird Quadrupol 3 (Q3) so eingestellt, dass diesen nur Ionen mit einem m/z -Wert von 79 passieren können, während mit Quadrupol 1 (Q1) kontinuierlich über den gesamten Massenbereich gescannt wird. Das auf diese Weise generierte Spektrum besteht nur aus Peaks von Vorläuferionen, die in der Stoßkammer ein Fragmentation mit einem m/z -Wert von 79 erzeugen. Die gleichen Phosphopeptid-spezifischen Ionen, die beim Vorläuferionen-Scan in der Stoßkammer generiert werden, lassen sich auch in der Skimmer-Region eines Massenspektrometers erzeugen (Skimmer-CID) und können bei einer HPLC-Kopplung als Phosphopeptid-Marker dienen (Huddleston et al., 1993; Ding et al., 1994; Jedrzejewski & Lehmann, 1997). Der Vorläuferionen-Scan wurde schon häufig zur selektiven Phosphopeptid-Detektion eingesetzt (z.B. Verma et al., 1997; Beuvink et al., 2000; Watty et al., 2000), dennoch ist diese Strategie mit einer Reihe von Nachteilen behaftet. Um im Negativ-Ionen-Modus eine ausreichende Ionisierungseffizienz zu erreichen, müssen die Lösungen einen basischen pH-Wert haben (Carr et al., 1996; Wilm et al., 1996), womit sowohl bei einer HPLC-Kopplung, als auch bei einer Fragmentationen-Analyse im Positiv-Ionen-Modus, Kompromisse hinsichtlich der Sensitivität eingegangen werden müssen. Hinzu kommt, dass die Phosphopeptid-spezifischen Fragmentationen H_2PO_4^- , PO_3^- und PO_2^- auch bei optimierten Kollisionsspannungen nur zu einem relativ niedriger Anteil gebildet werden, womit die Phosphopeptid-Detektion anhand dieser Fragmente in seiner Empfindlichkeit limitiert wird.

Das Phosphotyrosin-Immoniumion eignet sich grundsätzlich zur selektiven Detektion von Tyr-phosphorylierten Peptiden mittels Vorläuferionen-Scan im Positiv-Ionen-Modus (Lehmann 1999). Da aber bei der kollisionsinduzierten Fragmentierung von Peptiden im Positiv-Ionen-Modus auch eine ganze Reihe anderer Fragmentationen gebildet werden, die sich in ihrer Masse teilweise weniger als 30 mDa von dem Phosphotyrosin-Immoniumion unterscheiden, und diese Signale mit den bislang erhältlichen Tripel-Quadrupol-Massen-

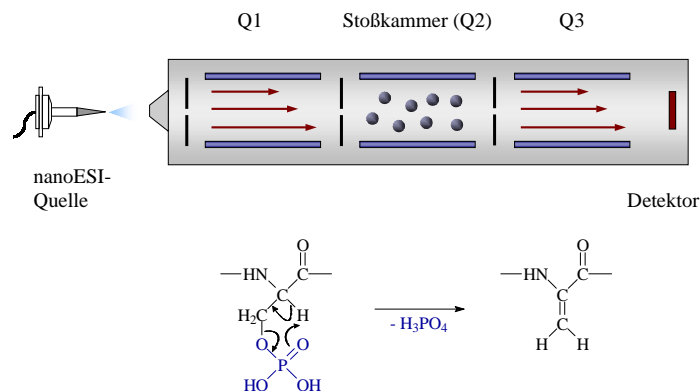


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Neutralverlust-Scans mit einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer zur selektiven Detektion von Ser/Thr-phosphorylierten Peptiden. Beim Scannen für den Neutralverlust von H_3PO_4 werden die beiden Quadrupole (Q1 und Q3) um die Masse von H_3PO_4 versetzt gescannt, wodurch nur Peptide, die in der Stoßkammer H_3PO_4 verlieren, zum Detektor gelangen.

spektrometern nicht mehr aufgelöst werden können, kann mit diesen Spektrometern nicht die gewünschte Selektivität erreicht werden (Steen et al., 2001a). Quadrupol-TOF-Massenspektrometer erreichen das notwendige Auflösungsvermögen, um das Phosphotyrosin-Immoniumion von anderen Ionen der gleichen Nominalmasse unterscheiden zu können, bieten aber nicht die instrumentelle Möglichkeit eines Vorläuferionen-Scans. Um mit diesen Spektrometern die gleiche Information wie bei einem Vorläuferionen-Scan zu erhalten, muss von jedem m/z -Wert ein Fragmentionen-Spektrum erzeugt werden. Aus diesen Daten lässt sich dann ein Spektrum generieren, das einem Vorläuferionen-Spektrum äquivalent ist. Obwohl bei dieser Methode Scanzeiten in der Größenordnung von 30 Minuten erforderlich sind, ist die erreichbare Empfindlichkeit dennoch sehr gut (Steen et al., 2001b).

Neutralverlust-Scan

Die Abspaltung von Phosphorsäure im Positiv-Ionen-Modus ist eine Fragmentierungsreaktion, die sich zur selektiven Detektion von Ser/Thr-phosphorylierten Peptiden mittels des sog. Neutralverlust-Scans eignet (Covey et al., 1991; Hunter & Games, 1994). In diesem Scan-Modus wird mit beiden Quadrupolen eines Tripel-Quadrupol-Massenspektrometers gleichzeitig, aber um einen bestimmten m/z -Wert versetzt gescannt, wodurch nur Molekülionen zum Detektor gelangen können, die in der Stoßkammer einen definierten Neutralverlust erleiden (siehe Abbildung 3.3). Einfach protonierte Ser/Thr-phosphorylierte Peptide lassen sich durch einen Neutralverlust-Scan für m/z 98.0 detektieren, zweifach protonierte durch einen Neutralverlust-Scan für m/z 49.0 und dreifach protonierte durch einen Neutralverlust-Scan für m/z 32.7. Im Gegensatz zur Bildung der Fragmentionen H_2PO_4^- und PO_3^- ist der Neutralverlust von H_3PO_4 , zumindest bei Phosphopeptiden bis etwa 15 Aminosäuren (siehe Abbildung 3.10), eine dominierende Fragmentierungsreaktion.

erwünschte Anreicherung von Peptiden mit sauren Resten (Asp und Glu) zu vermeiden, ist es zweckmäßig alle Carboxygruppen vor der Affinitätschromatographie in die Methyl-ester zu überführen (Ficarro et al, 2002). Die Elution der Phosphopeptide erfolgt in aller Regel mit Phosphatpuffer oder alternativ mit ammoniakalischer Lösung. Die Metallaffinitätschromatographie lässt sich sowohl *offline* (z.B. Posewitz & Tempst, 1999; Stensballe et al., 2001) als auch *online* (Nuwaysir & Stults, 1993) mit einer massenspektrometrischen Analyse kombinieren. Auch die *online*-Kopplung in Kombination mit anderen Trenntechniken, wie Umkehrphasen-Chromatographie (Watts et al., 1994) oder Kapillarelektrophorese (Cao & Stults, 1999; Cao & Stults, 2000), ist in der Literatur beschrieben. Die direkte Analyse der an das Affinitätsmaterial gebundenen Phosphopeptide ohne vorherige Elution ist mittels MALDI-MS möglich (Zhou et al., 2000). Kürzlich wurde demonstriert, dass die Metallaffinitätschromatographie auch für die Analyse eines Phosphoproteoms eingesetzt werden kann: Ficarro et al. konnten mittels IMAC und HPLC-Tandem-MS 383 Phosphorylierungsstellen in 216 Phosphopeptiden aus dem Zelllysate von Hefezellen bestimmen (Ficarro et al., 2002).

Neben der Metallaffinitätschromatographie lassen sich auch Antikörper für die selektive Anreicherung von Phosphopeptiden einsetzen (Kalo & Pasquale, 1999), allerdings ist diese Methode auf Tyr-phosphorylierte Peptide beschränkt, da mit Anti-Phosphoserin- und Anti-Phosphothreonin-Antikörpern nicht die notwendige Selektivität erreicht wird.

Kürzlich wurden in der Literatur zwei neu entwickelte Methoden beschrieben, bei denen Phosphopeptid-spezifische Modifizierungsreaktionen (*Chemical Tagging*) für die selektive Anreicherung von Phosphopeptiden eingesetzt werden. Bei einer der beiden Strategien werden die chemisch modifizierten Phosphopeptide kovalent an ein Affinitätsmaterial gebunden (Zhou et al., 2001), die Elution der Phosphopeptide erfolgt durch Hydrolyse. Diese Strategie ist auf Ser/Thr- und Tyr-phosphorylierte Peptide anwendbar. Die andere Strategie nutzt die β -Eliminierung von Phosphorsäure und die Addition eines Biotin-Labels an die dabei gebildete α, β -ungesättigte Carbonylverbindung (Oda et al., 2001) und ist in der Anwendbarkeit damit auf Ser/Thr-phosphorylierte Peptide beschränkt. Beide Strategien haben das Potential, Phosphopeptide auch aus sehr komplexen Mischungen heraus selektiv anzureichern zu können und sind damit grundsätzlich auch für die Analyse der Proteinphosphorylierung eines Proteoms geeignet.

Eine Strategie, bei der weder eine selektive Detektion, noch eine selektive Anreicherung von Phosphopeptiden zur Anwendung kommt, basiert auf dem Einsatz von Phosphatase (Larsen et al., 2001; Stensballe et al., 2001). Als Indikator für Phosphopeptide wird der 80-Da-Massenshift verwendet, den ein Phosphopeptid bei der Dephosphorylierung erleidet. Auch die online-Kopplung eines Enzym-Reaktors mit immobilisierter Phosphatase ist in

der Literatur beschrieben (Amankwa et al., 1995).

3.1.3 Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle

Für die exakte Lokalisierung der phosphorylierten Aminosäuren ist in aller Regel eine Fragmentationen-Analyse der identifizierten Phosphopeptide notwendig. Die am häufigsten angewandte Fragmentierungstechnik für diesen Zweck ist die kollisionsinduzierte Fragmentierung (z.B. Neubauer & Mann, 1999), die beispielsweise mit einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer, einem Quadrupol-TOF-Massenspektrometer oder einer Ionenfalle, durchgeführt werden kann. Alternativ lässt sich für diesen Zweck aber auch MALDI-*Post-Source-Decay* (Annan et al., 1996; Metzger & Hoffmann, 2000) oder MALDI-*In-Source-Decay* (Lennon & Walsh, 1999; Kinumi et al., 2000) einsetzen.

3.2 Neutralverlust-Scan

Angewandte Strategie

Der Neutralverlust von Phosphorsäure ist eine spezifische kollisionsinduzierte Fragmentierungsreaktion von Peptiden, die an Ser oder Thr phosphoryliert sind (vgl. Abbildung 3.2), kein anderes Peptid zeigt den Verlust eines Neutralteilchens mit einer relativen Molekülmasse von 98. Bei sulfatierten Peptiden, die durch ihre Modifizierung die gleiche nominale Massendifferenz wie bei einer Phosphorylierung (Sulfatierung: + 79.9568, Phosphorylierung: + 79.9663) aufweisen, dominiert der Neutralverlust von SO_3 (Rappsilber et al., 2001). Die Abspaltung der Phosphorsäure setzt bereits bei niedrigen Kollisionsspannungen, meist noch vor der Bildung von b- und y-Ionen, ein, und bleibt in aller Regel auch bei höheren Kollisionsspannungen die dominierende Fragmentierungsreaktion. Damit sind die Voraussetzungen gegeben, um Ser/Thr-phosphorylierte Peptide mittels Neutralverlust-Scan selektiv und mit hoher Empfindlichkeit in einer komplexen Peptidmischung detektieren zu können.

Zur Analyse der Proteinphosphorylierung mittels Neutralverlust-Scan wurde folgende Strategie angewandt: Nach der enzymatischen Spaltung des Phosphoproteins wurde das unaufgetrennte Peptidgemisch mit nanoESI-MS analysiert. Im ersten Schritt der Analyse wurden mittels Neutralverlust-Scans selektiv Phosphopeptide detektiert, von welchen im zweiten Schritt Fragmentationen-Spektren akquiriert wurden. Die Lokalisierung der phosphorylierten Aminosäuren in der Sequenz des Phosphoproteins erfolgte mit Hilfe der im Neutralverlust-Spektrum detektierten Massen der Phosphopeptide und der Sequenzinformation aus den Fragmentationen-Spektren.

Um die Anwendbarkeit der gewählten Strategie zur Analyse der Proteinphosphorylie-

zung zu untersuchen, wurde als Phosphoprotein die katalytische Untereinheit der Protein Kinase A (PKA) aus Rinderherz gewählt. Dieses Protein hat eine Größe von 40 kDa und ist an Thr197 und an Ser338 zu 100 % phosphoryliert (Shoji et al., 1979).

Trypsin-Verdau

Etwa 10 pmol der katalytischen Untereinheit der PKA wurden mit Trypsin inkubiert. Das aus dem Phosphoprotein gebildete Peptidgemisch wurde nach oben beschriebener Strategie analysiert. In Abbildung 3.5 a ist das Q1-Massenspektrum des Trypsin-Verdaus dargestellt, das etwa sechzig Peptidsignale zeigt. Die Abbildungen 3.5 b und 3.5 c zeigen die Neutralverlust-Spektren des Trypsin-Verdaus für m/z 49.0, zur selektiven Detektion zweifach protonierter Phosphopeptide, und für m/z 32.7, zur Detektion dreifach protonierter Phosphopeptide. Obwohl die Neutralverlust-Scans mit Kollisionsspannungen durchgeführt wurden, die zur Detektion der jeweiligen Phosphopeptide optimal sind (vgl. Abbildungen 3.13 und 3.14), ließen sich die Phosphopeptide nur mit schlechtem Signal-zu-Rausch-Verhältnis detektieren.

Bei Versuchen mit synthetischen Phosphopeptiden hatte sich gezeigt, dass kleine Phosphopeptide, bis zu einer Größe von etwa zehn Aminosäuren, eine effektivere H_3PO_4 -Abspaltung zeigen als große Phosphopeptide mit zwanzig oder mehr Aminosäuren (vgl. Abbildung 3.13). Kleinere Phosphopeptide lassen sich deshalb im Neutralverlust-Scan mit besserer Empfindlichkeit detektieren. In Anbetracht der Ergebnisse aus Abbildung 3.5 stellt sich die Frage, warum das 3 kDa große Phosphopeptid FKGPGDTSNFDDYEEEEI RVpSINEK durch Trypsin nicht zu dem empfindlicher detektierbaren Phosphopeptid VpSINEK gespalten wird. Die Vermutung lag nahe, dass eine Spaltung durch Trypsin nach Arg336 durch die Phosphorylierung an Ser338 inhibiert wird (Benore-Parsons et al., 1989). Eine analoge Inhibierung der Trypsinspaltung ist auch bei sauren Peptiden zu beobachten (Thiede et al., 2000). Um diese Hypothese testen zu können, wurden die Peptide IRVSI NEK und IRVpSINEK synthetisiert, und eine in etwa äquimolare Mischung dieser beiden Peptide wurde mit Trypsin inkubiert. Abbildung 3.6 zeigt das Q1-Massenspektrum dieser Peptidmischung vor und nach der Inkubation mit Trypsin. Die Spektren zeigen, dass das unphosphorylierte Peptid durch Trypsin gespalten wird, während das Phosphopeptid ungespalten bleibt. Das gleiche Experiment wurde auch mit folgenden aus der katalytischen Untereinheit der PKA abgeleiteten Peptiden durchgeführt: myrGDAAAAGSEQE SVK und myrGDAAAAGpSEQESVK, FRGSGDTSNF und FRGpSGDTSNF, VRFPS HFSSDLK und VRFpSHFSSDLK. Dabei hatte sich gezeigt, dass die Trypsin-Spaltung bei Peptiden der Sequenz R/K-X-pS in allen untersuchten Fällen inhibiert wird, während bei Peptiden der Sequenz R/K-X-X-pS keine Inhibierung zu finden war. Phosphoproteine mit der Sequenz R/K-X-pS/pT kommen *in vivo* häufig vor, da die Sequenz R/K-X-S/T

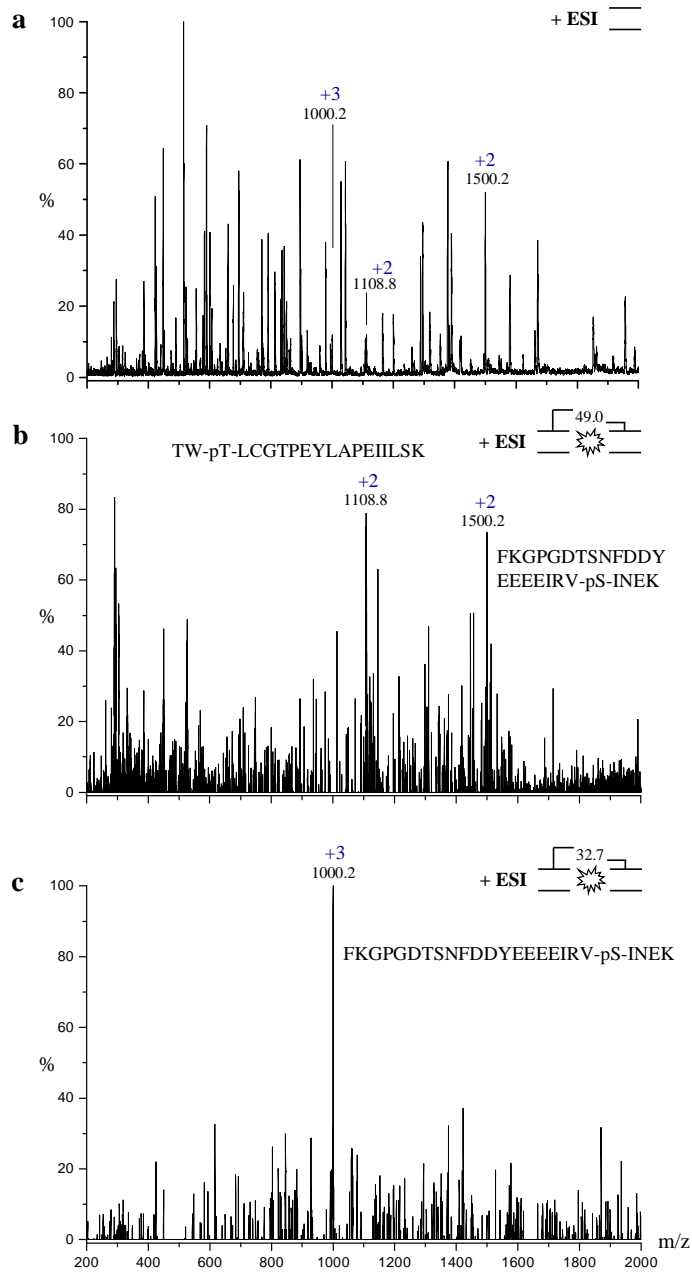


Abbildung 3.5: Massenspektren des Trypsin-Verdau der PKA aus Rinderherz. a) Q1-Massenspektrum; b) Neutralverlust-Spektrum für m/z 49.0 zur Detektion zweifach protonierter Phosphopeptide; c) Neutralverlust-Spektrum für m/z 32.7 zur Detektion dreifach protonierter Phosphopeptide. Die Neutralverlust-Scans wurden mit optimierten Kollisionsspannungen durchgeführt (vgl. Abbildung 3.13).

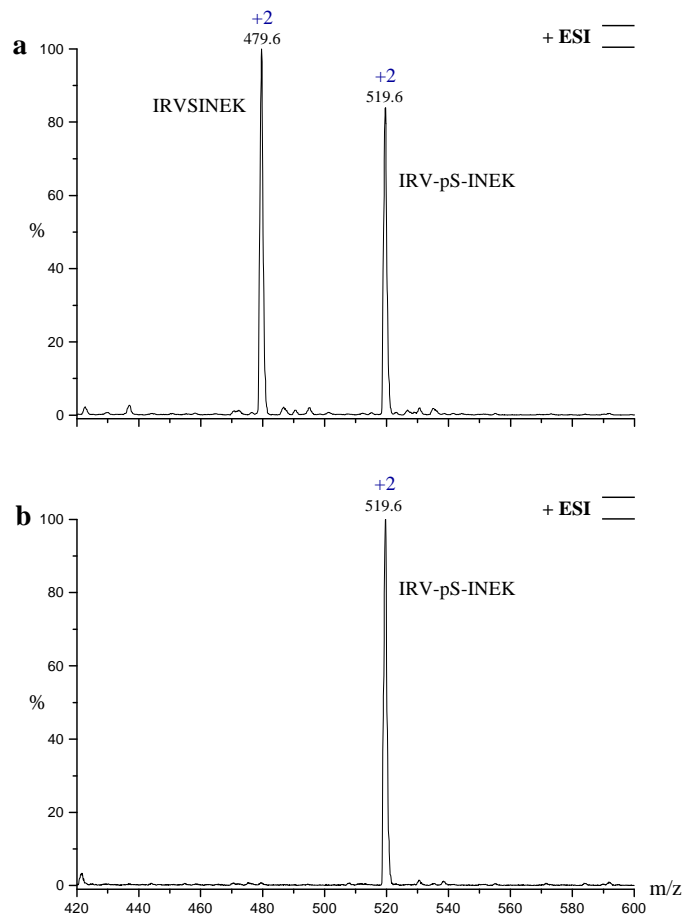


Abbildung 3.6: Q1-Massenspektren einer Mischung der Peptide IRVSINEK und IRVpSINEK. a) Vor der Inkubation mit Trypsin; b) nach der Inkubation mit Trypsin. Das Peptid IRVSINEK wird vollständig gespalten, während die Spaltung des Peptids IRVpSINEK durch die Phosphorylierung inhibiert wird.

eine Konsensussequenz der PKA ist, und diese Kinase eine Vielzahl von Substratproteinen besitzt (Spaulding, 1993). Dementsprechend häufig ist damit zu rechnen, dass die tryptischen Phosphopeptide eine Größe haben, die sowohl für einen Neutralverlust-Scan, als auch für einen Fragmentionen-Scan weniger gut geeignet ist. In der Konsequenz dieser Erkenntnisse wurden weniger spezifische Proteasen, die kleinere Phosphopeptide generieren, auf ihre Eignung zur Analytik der Proteinphosphorylierung untersucht.

Elastase-Verdau

Elastase zählt wie Trypsin zur Proteinfamilie der Serin-Proteasen. Im Gegensatz zu Trypsin (Spaltung nach Arg und Lys) lässt sich für Elastase aber keine exakt definierte Spaltungsspezifität angeben, lediglich eine gewisse Präferenz für die Spaltung nach ungeladenen und kleinen Seitenketten (wie z.B. bei Gly, Ala, Ser, Cys) ist zu beobachten (Tomomura, 1998). Bei der enzymatischen Spaltung eines Proteins mit Elastase wird im Vergleich zu Trypsin deshalb eine größere Anzahl an kleineren Peptiden generiert.

Etwa 10 pmol der katalytischen Untereinheit der PKA wurden mit Elastase verdaut

und mit nanoESI-MS analysiert. In Abbildung 3.7 a ist das Q1-Massenspektrum des Elastase-Verdaus dargestellt. Dieses weist eine deutlich größere Anzahl an Peaks auf (über 150) als das Spektrum des Trypsin-Verdaus (vgl. Abbildung 3.5 a). Die Abbildungen 3.7 b und 3.7 c zeigen die entsprechenden Neutralverlust-Spektren für m/z 98.0 und m/z 49.0 zur Detektion einfach und zweifach protonierter Phosphopeptide. Insgesamt wurden in den beiden Neutralverlust-Spektren acht Phosphopeptide mit relativen Molekülmassen von 654.3, 858.4, 915.4, 940.5, 1014.5, 1027.5, 1043.5 und 1426.8 detektiert. Drei dieser Phosphopeptide haben eine basische Aminosäure (Arg oder Lys), vier haben zwei, und ein Phosphopeptid hat vier basische Aminosäuren. Im Neutralverlust-Scan für m/z 98.0 ließen sich alle acht Phosphopeptide als einfach protonierte Peptide detektieren, wohingegen im Neutralverlust-Scan für m/z 49.0 nur die Phosphopeptide mit zwei oder mehr basischen Aminosäuren detektierbar waren.

Abbildung 3.8 zeigt eine Ausschnittsvergrößerung von Abbildung 3.7 b, in der die Isotopenauflösung der einzelnen Peaks zu erkennen ist. Alle im Neutralverlust für m/z 98.0 detektierten Signale tragen den Ladungszustand +1, und werden somit eindeutig von Phosphopeptiden verursacht. Der Neutralverlust-Scan für m/z 98.0 zeigt eine sehr gute Selektivität für Phosphopeptide: alle detektierten Signale konnten Phosphopeptiden aus der katalytischen Untereinheit der PKA zugeordnet werden, kein Signal wurde durch ein unphosphoryliertes Peptid verursacht. In Abbildung 3.9 wird der Effekt des Neutralverlust-Scans noch einmal durch eine graphische Überlagerung von Q1-Massenspektrum und Neutralverlust-Spektrum verdeutlicht. Von der Vielzahl teilweise überlagerter Peaks im Q1-Massenspektrum werden im Neutralverlust-Spektrum selektiv nur die Isotopenmuster der Phosphopeptide detektiert. Ein Vorteil des Elastase-Verdaus, das Generieren überlappender Phosphopeptide, könnte sich hinsichtlich der Nachweisempfindlichkeit negativ auswirken, da sich die Intensität für ein Phosphopeptid dadurch auf mehrere Signale verteilt.

Identifizierung von Phosphopeptiden eines Elastase-Verdaus

Bei einer Massenpräzision von etwa 100 ppm, wie sie routinemäßig mit einem Trippel-Quadrupol-Massenspektrometer erreicht werden kann, ist die Identifizierung eines im Elastase-Verdau detektierten Phosphopeptids allein anhand seiner Molekülmasse nicht eindeutig möglich. Um diesen Aspekt an zwei Beispielen zu verdeutlichen, sind in Tabelle 3.2 alle theoretisch möglichen Peptide und Phosphopeptide mit einer relativen Molekülmasse von 1014.5 ± 0.2 bzw. 1027.5 ± 0.2 aufgelistet, die bei einer proteolytischen Spaltung der C α - und C β -Untereinheit der PKA gebildet werden können.

Phosphopeptide mit diesen Molekülmassen wurden in den entsprechenden Neutralverlust-Spektren (siehe Abbildungen 3.7 b und 3.7 c) registriert. Mit den Molekülmassen

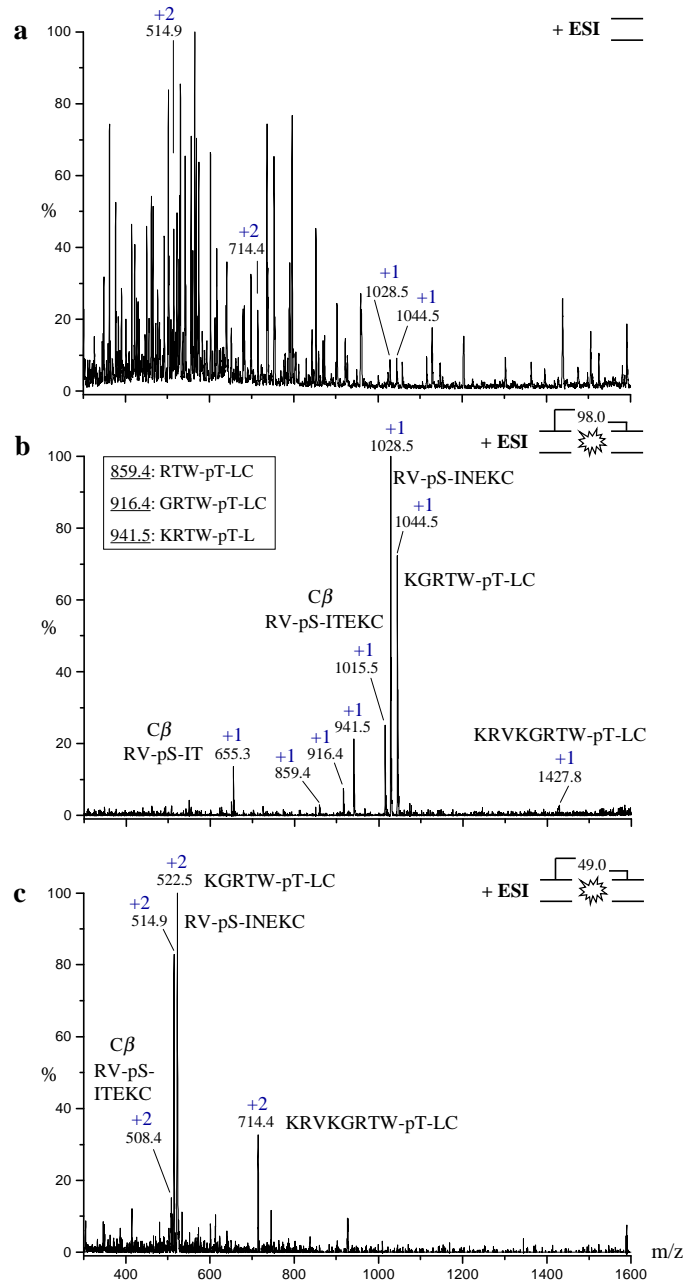


Abbildung 3.7: Massenspektren des Elastase-Verdau der PKA aus Rinderherz. a) Q1-Massenspektrum; b) Neutralverlust-Spektrum für m/z 98.0 zur Detektion einfach protonierter Phosphopeptide; c) Neutralverlust-Spektrum für m/z 49.0 zur Detektion zweifach protonierter Phosphopeptide. Die Neutralverlust-Scans wurden mit optimierten Kollisionsspannungen durchgeführt (vgl. Abbildung 3.13). Die Sequenzen zweier Phosphopeptide sind spezifisch für die $C\beta$ -Untereinheit der PKA.

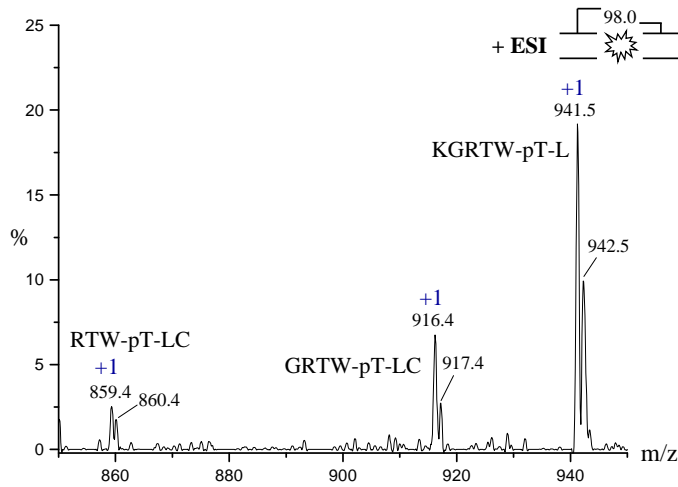


Abbildung 3.8: Neutralverlust-Spektrum des Elastase-Verdaus der katalytischen Untereinheit der PKA (Ausschnittsvergrößerung von Abbildung 3.7 b). In der Vergrößerung ist die Isotopenauflösung der einzelnen Peaks zu erkennen.

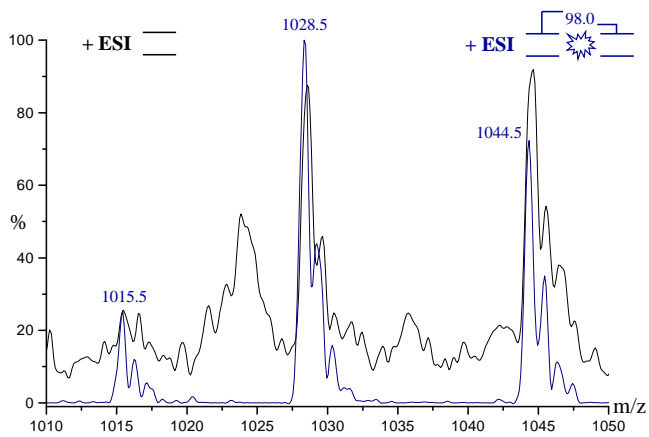


Abbildung 3.9: Überlagerung des Q1-Massenspektrums (schwarz) und des Neutralverlust-Spektrums (blau) des Elastase-Verdaus der PKA aus Rinderherz (Abbildung 3.7 a und b).

Tabelle 3.1: Liste aller aus der $C\alpha$ - und $C\beta$ -Untereinheit der PKA theoretisch möglichen Peptide und Phosphopeptide mit einer relativen Molekülmasse von 1014.5 ± 0.2 bzw. 1027.5 ± 0.2 . Aus dieser Liste von Peptiden wurden mit Hilfe der Sequenzinformationen aus den entsprechenden Fragmentionen-Spektren (siehe Abbildung 3.10) die Phosphopeptide RVpSITEKC ($C\beta$) und RVpSINEKC ($C\alpha$) identifiziert.

Δm	calc. M_r	Position	Untereinheit	Sequenz
0.01	1014.49	38 - 45	$C\alpha$	AHLDQFER
0.01	1014.49	275 - 282	$C\alpha, C\beta$	VDL-pT-KRFG
0.04	1014.46	336 - 343	$C\beta$	RV-pS-ITEKC
0.04	1014.46	336 - 343	$C\beta$	RVSI-pT-EKC
0.05	1014.45	281 - 289	$C\beta$	FGNLKNGV-pS-
0.11	1014.39	10 - 17	$C\alpha$	-pS-EQESVKE
0.11	1014.39	10 - 17	$C\alpha$	SEQE-pS-VKE
-0.12	1014.62	248 - 256	$C\alpha, C\beta$	EKIVSGKVR
-0.01	1027.51	59 - 67	$C\alpha$	LVKHMETGN
-0.02	1027.52	277 - 284	$C\alpha, C\beta$	L-pT-KRFGNL
0.04	1027.46	5 - 13	$C\beta$	-pT-AKKGSEVE
0.04	1027.46	5 - 13	$C\beta$	TAKKG-pS-EVE
0.05	1027.45	336 - 343	$C\alpha$	RV-pS-INEKC
0.07	1027.43	121 - 129	$C\alpha, C\beta$	EYVPGGEMF
0.20	1027.40	260 - 267	$C\alpha, C\beta$	HF-pS-SDLKD
0.20	1027.40	260 - 267	$C\alpha, C\beta$	HFS-pS-DLKD
-0.11	1027.61	309 - 317	$C\alpha, C\beta$	KVEAPFIPK
0.15	1027.35	295 - 301	$C\alpha, C\beta$	KWFA-pT-pT-D

1014.5 und 1027.5 sind jeweils fünf Ser/Thr-phosphorylierte Peptide kompatibel, insgesamt vier dieser zehn Phosphopeptide enthalten mehr als einen Ser- oder Thr-Rest. Die eindeutige Identifizierung der Phosphopeptide und die exakte Lokalisierung der phosphorylierten Aminosäuren wird durch Sequenzinformation, die sich aus den Fragmentationenspektren der entsprechenden Peptide erhalten lässt, ermöglicht. In Abbildung 3.10 sind die Fragmentationenspektren der beiden zweifach protonierten Phosphopeptide mit den relativen Molekülmassen 1014.5 und 1027.5 dargestellt. Beide Spektren weisen neben der erwarteten Phosphorsäureabspaltung aus dem Moleküllion eine durchgängige b-Ionen-Serie von b_2 bis b_6 auf, aus der sich die Sequenz pSITE bzw. pSINE ableiten lässt. Mit dieser Information lässt sich die Molekülmasse 1014.5 eindeutig dem Phosphopeptid RVpSITEK aus der C β -Untereinheit der PKA zuordnen, die Molekülmasse 1027.5 eindeutig dem Phosphopeptid RVpSINEK aus der C α -Untereinheit. Die Aminosäuresequenzen der C α - und C β -Untereinheiten unterscheiden sich an insgesamt 19 Positionen, unter anderem an Position 340, an der bei C α Asn kodiert ist, bei C β Thr. Die Massendifferenz, die durch die 19 unterschiedlichen Aminosäuren zwischen den beiden Untereinheiten verursacht wird, beträgt 26.0 Da (siehe Abbildung 3.12).

Sind alle Phosphorylierungsstellen erfasst?

Das Ziel einer Phosphorylierungsanalytik ist die vollständige Erfassung aller Phosphorylierungsstellen eines Proteins, was voraussetzt, dass bei der Analyse des Proteinverdaus alle Phosphopeptide erfasst werden. Dies wird aber durch folgende Faktoren erschwert: (i) Bereits bei der Präparation eines Phosphoproteins kann es, durch die Anwesenheit von Phosphatasen, zur Dephosphorylierung von Aminosäuren kommen. (ii) Phosphopeptide werden im Positiv-Ionen-Modus in vielen Fällen mit einer geringeren Sensitivität detektiert als die entsprechenden unphosphorylierten Peptide (Carr et al., 1996; siehe auch Abbildung 3.19). Dies steht vermutlich im Zusammenhang mit dem stark sauren Charakter der Phosphatgruppe. (iii) Die isolierten Phosphoproteine sind häufig nur partiell an einer bestimmten Position phosphoryliert. Die Menge an Phosphopeptid kann damit leicht unter die Nachweisgrenze fallen. (iv) Phosphopeptide sind häufig relativ hydrophil, was dazu führen kann, dass sie bei der Reversed-Phase-Chromatographie nicht an die C $_{18}$ -Phase binden und somit bei der Entsalzung verloren gehen (siehe Abbildung 3.18). (v) Phosphopeptide haben die Eigenschaft mit mehrwertigen Metallionen Komplexe zu bilden. Durch den Kontakt eines Peptidgemisches mit Oberflächen, die Spuren von Metallen enthalten, kann es dadurch zu einer selektiven, in der Regel irreversiblen, Anreicherung von Phosphopeptiden kommen.

Durch eine typische Eigenschaft der Elastase, das Generieren von partiell überlappenden Peptiden, ist die Wahrscheinlichkeit alle Phosphorylierungsstellen zu erfassen bei Ver-

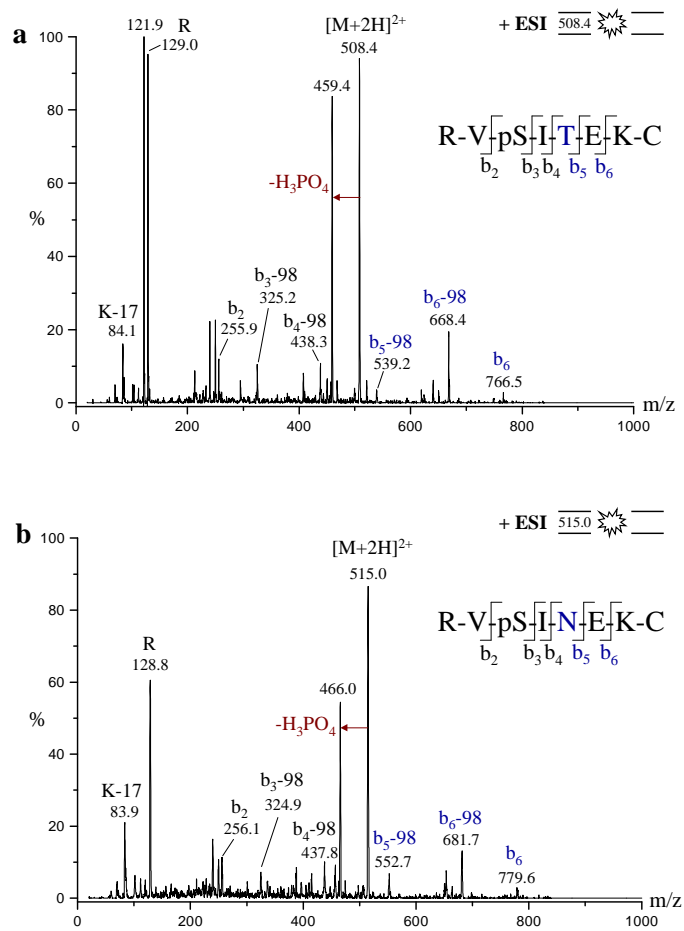


Abbildung 3.10: Fragmentation-Spektren zweier Phosphopeptide, die im Neutralverlust-Spektrum für m/z 49.0 detektiert wurden. a) Fragmentation-Spektrum des zweifach protonierten Peptids RVpSITEKC; b) Fragmentation-Spektrum des zweifach protonierten Peptids RVpSINEKC. Das Peptid RVpSITEKC stammt aus der $C\beta$ -Untereinheit, das Peptid RVpSINEKC aus der $C\alpha$ -Untereinheit der PKA. Beide Spektren zeigen eine b-Ionen-Serie von b_2 bis b_6 , aus der sich sowohl die exakte Position der Phosphorylierungsstelle, als auch die Aminosäure an Position 34 (Thr bzw. Asn) eindeutig bestimmen lassen.

wendung von Elastase größer als bei Verwendung von Trypsin, das in den meisten Fällen nur ein Phosphopeptid pro Phosphorylierungsstelle generiert. Geht ein Phosphopeptid bei der Probenvorbereitung verloren (vgl. Abbildung 3.18) oder hat eine schlechte Ionisierungseffizienz, dann wird im Falle von Trypsin die entsprechende Phosphorylierungsstelle nicht erfasst. Im Falle von Elastase besteht dagegen die Chance, dass ein überlappendes Phosphopeptid günstigere Eigenschaften besitzt. Die Entstehung überlappender Fragmente hat seine Ursache wahrscheinlich darin, dass die katalytische Aktivität der Elastase mit abnehmender Peptidgröße abnimmt (Bieth, 1986). Somit sind Peptide unter einer gewissen Größe keine geeigneten Substrate mehr und werden nicht weiter gespalten.

Abbildung 3.11 fasst die im Trypsin- und im Elastase-Verdau der katalytischen Untereinheiten der PKA identifizierten Phosphopeptide zusammen. Im Elastase-Verdau wurden fünf Phosphopeptide mit pThr197 identifiziert, ein Phosphopeptid mit pSer338 aus der C α -Untereinheit und zwei Phosphopeptide mit pSer338 aus der C β -Untereinheit. Im Trypsin-Verdau konnten lediglich je ein Phosphopeptid mit pThr197 und mit pSer338 (C α) identifiziert werden. Auf die Anwesenheit der C β -Untereinheit konnten im Trypsin-Verdau keine Hinweise gefunden werden.

Um zu kontrollieren, ob alle Phosphorylierungsstellen erfasst wurden, kann die Molekülmasse des intakten Phosphoproteins bestimmt werden. Abbildung 3.12 zeigt das nano ESI-TOF-Massenspektrum der katalytischen Untereinheit der PKA aus Rinderherz, die an Thr197 und an Ser338 zu 100 % phosphoryliert (Shoji et al., 1979) und am N-Terminus durch Myristinsäure (Tetradecansäure) modifiziert (Carr et al., 1982) ist. Für die C α -Untereinheit berechnet sich aus der Aminosäuresequenz (40488.8), der Myristinsäuremodifikation (210.2) und den beiden Phosphorylierungen (160.0) eine theoretische mittlere Molekülmasse von 40858.8, für die C β -Untereinheit berechnet sich eine entsprechende mittlere Molekülmasse von 40832.8. Die experimentell bestimmten Molekülmassen weichen weniger als 1 Da von diesen Werten ab. Dies zeigt, dass die Zahl der Phosphorylierungsstellen aus der Molekülmasse des intakten Proteins bestimmt werden kann, wenn die Aminosäuresequenz und eventuell vorhandene andere kovalente Modifikationen bekannt sind.

Eine Molekülmassenbestimmung für ein intaktes Protein setzt in aller Regel voraus, dass das Protein in Lösung vorliegt, da die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Extraktion von intakten Proteinen aus Polyacrylamidgelen (Schuhmacher et al., 1996; Cohen & Chait, 1997; Ehring et al., 1997; Yefimov et al., 2000) wenig effektiv sind. Zudem ist eine Entfernung des SDS, das sich durch Adduktbildung mit dem Protein bei der MS-Analyse störend auswirkt, bei geringen Proteinnengen problematisch.

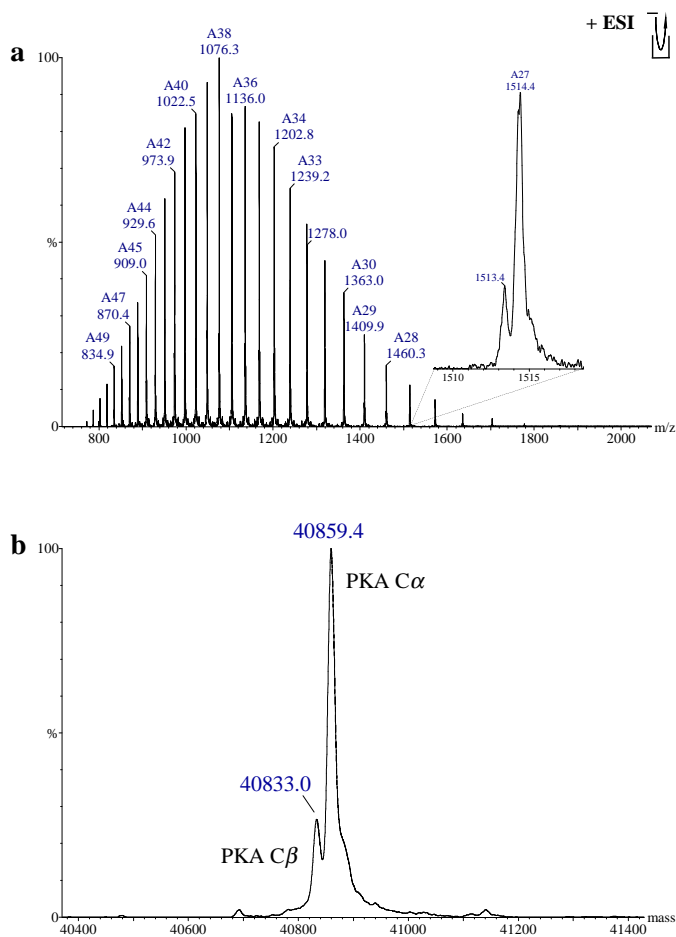


Abbildung 3.12: NanoESI-TOF-Massenspektrum der katalytischen Untereinheit der PKA aus Rinderherz. a) NanoESI-TOF-Massenspektrum mit einer Ausschnittsvergrößerung des 27fach protonierten Ions; b) Dekonvolviertes Massenspektrum. Das Spektrum zeigt zwei Peaks mit einer Massendifferenz von 26.0 Da, die der erwarteten Differenz zwischen der C α - und der C β -Untereinheit entspricht. Die experimentell bestimmten mittleren Molekülmassen der beiden Untereinheiten weichen weniger als 1 Da von den berechneten Werten ab.

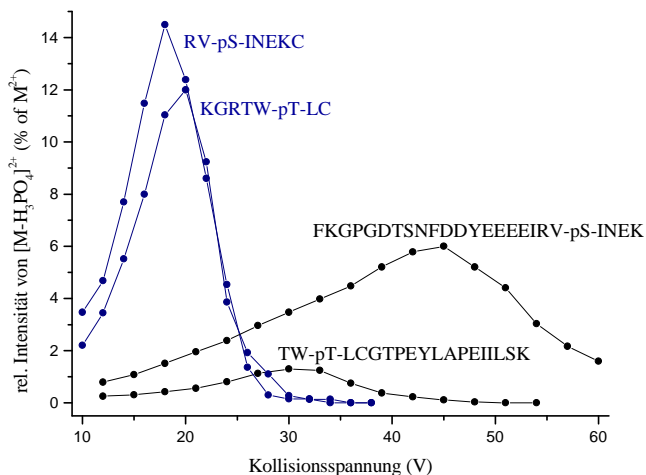


Abbildung 3.13: Kollisionsspannungs-Plots für die H_3PO_4 -Abspaltung aus zweifach protonierten Phosphopeptiden. Die beim Elastase-Verdau der $\text{C}\alpha$ -Untereinheit generierten Peptide (blau) zeigen im Vergleich zu den Trypsin-generierten Peptiden (schwarz) eine effektivere H_3PO_4 -Abspaltung.

Optimierung der Kollisionsspannung

Um die Empfindlichkeit des Neutralverlust-Scans zu optimieren, wurde für eine Reihe von Phosphopeptiden die Effektivität der H_3PO_4 -Abspaltung in Abhängigkeit der Kollisionsspannung untersucht. Abbildung 3.13 zeigt einen Vergleich der Kollisionsspannungs-Plots für zwei Elastase-generierte und zwei Trypsin-generierte Phosphopeptide. Für die dargestellten Plots wurde für jedes Peptid die Intensität des $[\text{M}-\text{H}_3\text{PO}_4+2\text{H}]^{2+}$ -Signals in Abhängigkeit der Kollisionsspannung gemessen. Um die H_3PO_4 -Abspaltung unterschiedlicher Peptide quantitativ miteinander vergleichen zu können, wurde die Intensität der $[\text{M}-\text{H}_3\text{PO}_4+2\text{H}]^{2+}$ -Signale auf die des jeweiligen $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ -Signals normiert.

An den Kollisionsspannungs-Plots ist zum einen zu erkennen, dass die für eine maximale H_3PO_4 -Abspaltung notwendige Kollisionsspannung von der Masse der Phosphopeptide abhängig ist. Für die Elastase-generierten Peptide, mit einer relativen Molekülmasse von etwa 1000, ergibt sich ein Maximum bei 18 V, für die Trypsin-generierten Peptide, mit einer relativen Molekülmasse von 2200 bzw. 3000, wird das Maximum der H_3PO_4 -Abspaltung bei 30 bzw. 45 V erreicht. Zum anderen zeigt der Vergleich, dass die H_3PO_4 -Abspaltung bei den kleineren Elastase-generierten Phosphopeptiden deutlich effektiver ist als bei den Trypsin-generierten. Die mit Elastase generierten Phosphopeptide lassen sich somit im Neutralverlust-Scan mit einer besseren Empfindlichkeit nachweisen.

Die Abhängigkeit der optimalen Kollisionsspannung von der Phosphopeptidgröße wurde auch an den einfach protonierten Peptiden der Sequenz VpSINEK, VRFPpSSHFSDDLK, KGpSEQESVKEFLAK und myrGDAAAkkGpSEQEES und an den zweifach protonierten Peptiden der Sequenz VpSINEK, IRVpSINEK, RVpSINEKC, RVpSITEKC, KGRTWpTLC, VRFPpSSHFSDDLK, KGpSEQESVKEFLAK und myrGDAAAkkGpSEQEES untersucht. In Abbildung 3.14 ist das Ergebnis dieser Messungen dargestellt. Sowohl die Abhängigkeit einfach protonierter, als auch die zweifach protonierter Phosphopep-

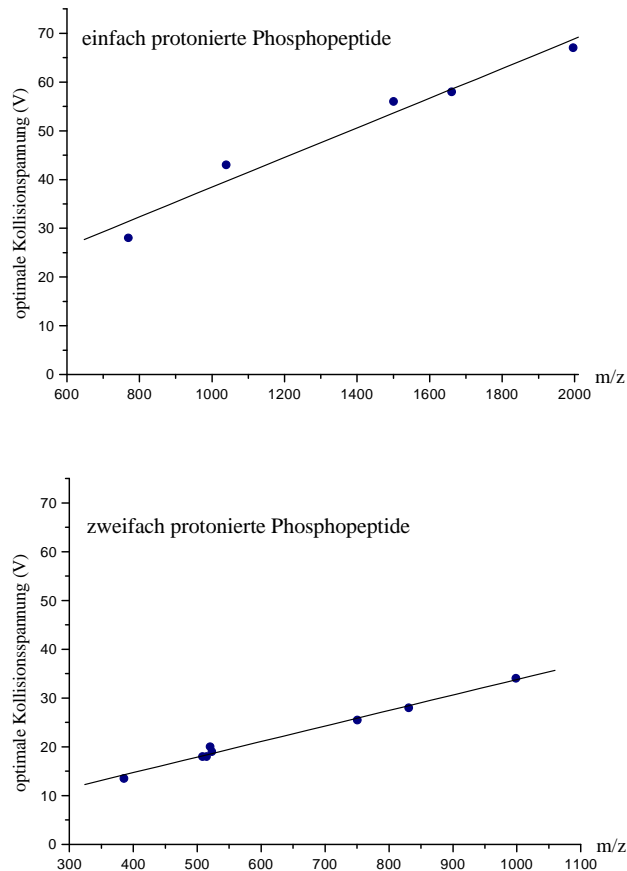


Abbildung 3.14: Optimale Kollisionsspannungen für die H_3PO_4 -Abspaltung aus unterschiedlichen Phosphopeptiden als Funktion von m/z . a) Einfach protonierte Peptide: VpSINEK, VRFPpSSHFSDDLK, KGpSEQESVKEFLAK und myrGDAAAkkGpSEQEES; b) zweifach protonierte Peptide: VpSINEK, IRVpSINEK, RVpSINEK, RVpSITEKC, KGRTWpTLC, VRFPpSSHFSDDLK, KGpSEQESVKEFLAK und myrGDAAAkkGpSEQEES. Mittels linearer Regression wurden aus den Daten folgende Funktionen ermittelt: $y = 8.0 + 0.0304x$ für einfach protonierte Phosphopeptide, und $y = 2.0 + 0.0159x$ für zweifach protonierte Phosphopeptide.

tide lässt sich gut mittels einer linearen Funktion wiedergeben. Lineare Regression ergab die Funktion $y = 8.0 + 0.0304x$ für einfach protonierte Peptide und die Funktion $y = 2.0 + 0.0159x$ für zweifach protonierte Peptide. Es ist möglich das Massenspektrometer mit diesen Funktionen zu programmieren, so dass bei einem Neutralverlust-Scan automatisch die optimale Kollisionsspannung verwendet wird.

Sensitivität des Neutralverlust-Scans

Um die Empfindlichkeit des Neutralverlust-Scans an einem Trypsin- und einem Elastase-Verdau des gleichen Proteins direkt vergleichen zu können, wurde ein Neutralverlust-Scan an einer Mischung durchgeführt, die zu äquimolaren Mengen aus einem Trypsin- und einem Elastase-Verdau der katalytischen Untereinheit der PKA bestand. Abbildung 3.15 zeigt das Neutralverlust-Spektrum für die zweifach protonierten Phosphopeptide dieser Mischung. Der Neutralverlust-Scan wurde über die gleichen Zeiträume mit Kollisionsspannungen von 18, 30 und 45 V durchgeführt. Diese Spannungen entsprechen den für die H_3PO_4 -Abspaltung der jeweiligen Phosphopeptide optimalen Bedingungen (vgl. Ab-

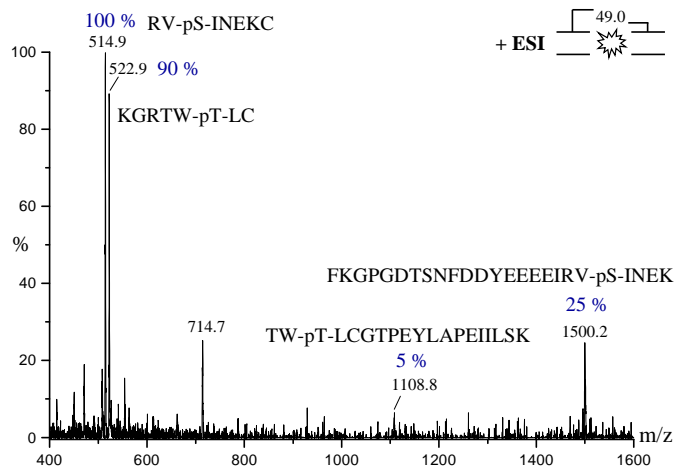


Abbildung 3.15: Neutralverlust-Spektrum für m/z 49.0 zur Detektion zweifach protonierter Phosphopeptide. Die analysierte Probe enthielt eine äquimolare Mischung eines Trypsin- und eines Elastase-Verdau der PKA aus Rinderherz. Der Neutralverlust-Scan wurde über die gleichen Zeiträume bei 18, 30 und 45 V durchgeführt. Diese Kollisionsspannungen entsprechen den für die H_3PO_4 -Abspaltung der jeweiligen Peptide optimalen Bedingungen (vgl. Abbildung 3.13).

bildung 3.13). Das Signal für das Elastase-generierte Phosphopeptid KGRTWpTLC, das die Phosphorylierungsstelle an Position 197 enthält, zeigt eine 18-mal größere Intensität als das entsprechende Trypsin-generierte Peptid mit der Sequenz TWpTLCGTPEYLAPEIILSK. Vergleicht man die Elastase- und Trypsin-generierten Peptide, die die Phosphorylierungsstelle an Position 338 enthalten, zeigt sich, dass das Signal für das Elastase-generierte Phosphopeptid um den Faktor vier intensiver ist. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit denen aus Abbildung 3.13 zeigt, dass die Effektivität der H_3PO_4 -Abspaltung eines Phosphopeptids wie erwartet ein wichtiger Faktor für dessen Nachweisempfindlichkeit im Neutralverlust-Scan ist. Da die Trypsin-generierten Peptide im direkten Vergleich noch etwas schlechter abschneiden als allein aufgrund der weniger effektiven H_3PO_4 -Abspaltung zu erwarten wäre, spielen offensichtlich auch noch andere Faktoren, wie beispielsweise die schlechtere Transmission für Ionen mit größeren m/z -Werten, eine Rolle.

Spezifität des Neutralverlust-Scans

Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis eines Neutralverlust-Spektrums wird zum einen durch die Effektivität der H_3PO_4 -Abspaltung, zum anderen durch das Auftreten von interferierenden Signalen bestimmt. Im vorangegangenen Abschnitt wurde diskutiert, wie sich die Effektivität der H_3PO_4 -Abspaltung durch das Generieren kleinerer Phosphopeptide (Verwendung von Elastase) und die Wahl der richtigen Kollisionsspannung optimieren lässt. Interferierende Signale können durch mehrfach protonierte Peptide entstehen, wenn diese ein Fragmentation mit einem m/z -Wert von $M-98$ (Neutralverlust-Scan für m/z 98.0) oder von $M-49$ (Neutralverlust-Scan für m/z 49.0) generieren. In einer solchen Situation kommt es zu einem falsch-positiven Signal im Neutralverlust-Spektrum. Ein Vergleich der Spektren des Elastase-Verdau der PKA zeigt, dass das Neutralverlust-Spektrum für

m/z 98.0 (Abbildung 3.7 b) ein deutlich besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweist als das für m/z 49.0 (Abbildung 3.7 c). Bei den Neutralverlust-Scans für m/z 49.0 wurden Kollisionsspannungen zwischen 15 und 25 V verwendet, bei den Neutralverlust-Scans für m/z 98.0 Kollisionsspannungen zwischen 30 und 50 V. Kollisionsspannungen zwischen 15 und 25 V sind auch optimal für die Induzierung von sequenzspezifischen Fragmentationen bei mehrfach protonierten Peptiden, womit die Wahrscheinlichkeit, dass hier interferierende Signale erzeugt werden relativ hoch ist. Bei Kollisionsspannungen zwischen 30 und 50 V sind die mehrfach protonierten Peptide hingegen in aller Regel schon weitgehend zu kleineren Ionen (Immoniumionen, Dipeptidionen) fragmentiert, die keine interferierenden Signale im Neutralverlust-Scan verursachen können. Trotz des schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses liefern die Neutralverlust-Spektren für zweifach und dreifach protonierte Phosphopeptide oftmals wertvolle Informationen, beispielsweise bei Phosphopeptiden mit vielen basischen Aminosäuren, die kaum einfach protonierte Ionen bilden. So hat z.B. das Peptid mit der Sequenz KRVKGRTWpTLC vier basische Aminosäuren und ist im Neutralverlust-Spektrum für m/z 98.0 gerade noch zu detektieren, wohingegen es im Neutralverlust-Spektrum für m/z 49.0 ein intensives Signal erzeugt (siehe Abbildung 3.7 b und 3.7 c).

Enthalten die zu analysierenden Proben Phosphat, wie z.B. im Fall von *in-vitro*-Kinaseassays, dann hat sich eine gründliche Entsalzung als besonders wichtig erwiesen, da Phosphat effektiv nicht-kovalente Komplexe mit Peptiden bildet (Chowdhury et al., 1990). Bei kollisionsinduzierter Fragmentierung spalten diese nicht-kovalenten Komplexe bei sehr ähnlichen Kollisionsspannungen wie Phosphopeptide Phosphorsäure ab und sind damit im Neutralverlust-Scan von diesen nicht zu unterscheiden.

Das synthetische Phosphopeptid der Sequenz EAQAAPSAQAK ließ sich nicht mittels Neutralverlust-Scan für m/z 98.0 oder m/z 49.0 nachweisen, da es bei diesem Peptid neben der H_3PO_4 -Abspaltung gleichzeitig zu einer effektiven Abspaltung von Wasser (Pyroglutamatbildung am N-Terminus) kommt. Phosphopeptide mit N-terminalem Glu lassen sich deshalb nur mit einem Neutralverlust-Scan für m/z 116.0 oder m/z 58.0 nachweisen. Eine weitere Komplikation wurde bei einem Phosphopeptid entdeckt, bei dem das phosphorylierte Serin Teil einer SSS-Sequenz war. Hier kommt es aus nicht geklärten Gründen vor allem zu einem Neutralverlust von HPO_3 (Neutralverlust von 80.0 bzw. 40.0). Ein Phosphopeptid mit zwei phosphorylierten Aminosäuren ließ sich hingegen problemlos mittels Neutralverlust-Scan detektieren. Das untersuchte Peptid zeigte in etwa gleichem Ausmaß die Abspaltung von einem Molekül und von zwei Molekülen Phosphorsäure.

3.3 Metallaffinitätschromatographie

Die Metallaffinitätschromatographie (IMAC) ermöglicht, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, die selektive Anreicherung von Phosphopeptiden aus einem komplexen Peptidgemisch. Bei der Anwendung dieser Affinitätschromatographie auf einen Elastase-Verdau eines Phosphoproteins resultiert ein mittels nanoESI-Tandem-MS gut charakterisierbares Peptidgemisch. Um das Potential der Kombination aus Elastase-Verdau, IMAC und Q-TOF-Tandem-Massenspektrometrie zu untersuchen, wurde die rekombinante C α -Untereinheit der PKA als Modell-Phosphoprotein gewählt.

Modell-Phosphoprotein: Rekombinante PKA C α -Untereinheit

Bei der Expression der katalytischen α -Untereinheit der PKA in *e. coli* kommt es zu einer Autophosphorylierung dieses Enzyms (Toner-Webb et al., 1992), wobei ein Gemisch aus zweifach, dreifach und vierfach phosphoryliertem Protein gebildet wird. Diese unterschiedlichen Phosphorylierungsstufen der PKA lassen sich mittels Kationenaustauscher-Chromatographie (Mono S) trennen (Herberg et al., 1993). Das Chromatogramm einer solchen Trennung ist in Abbildung 3.16 dargestellt. Die Fraktionen I, II und III wurden mittels nanoESI-TOF-MS analysiert, und die experimentell bestimmten Molekülmassen (I: 40812.9 Da, II: 40729.5 Da, III: 40648.5 Da) zeigen gute Übereinstimmung mit den berechneten Werten für zweifach (40648.8 Da), dreifach (40728.8 Da) und vierfach (40808.8 Da) phosphorylierte C α -Untereinheit der PKA. Exemplarisch ist in Abbildung 3.17 das dekonvolutierte TOF-Massenspektrum des vierfach phosphorylierten Proteins dargestellt. Von der Fraktion der vierfach phosphorylierten PKA wurden von unterschiedlichen Proteinmengen Coomassie-gefärbte Gelbanden erzeugt, die als Ausgangsmaterial für die MS-Analysen dienen.

Trypsin-Verdau: Unvollständige Charakterisierung der Phosphorylierungsstellen

Bei dem Versuch die vier Phosphorylierungsstellen der C α -Untereinheit der PKA anhand eines Trypsin-Verdau zu charakterisieren, konnten nur drei (Ser139, Thr197 und Ser338) der vier bekannten Phosphorylierungsstellen (Yonemoto et al., 1993) lokalisiert werden. Das erwartete Phosphopeptid mit der Sequenz KGpSEQESVK (T2-3), welches die vierte Phosphorylierungsstelle (Ser10) enthalten sollte, konnte nicht nachgewiesen werden. Um zu klären, warum das erwartete Phosphopeptid nicht detektiert werden konnte, wurde das synthetische Peptid KGpSEQESVKEFLAK (T2-4) mit Trypsin in die Peptide KGpSEQESVK (T2-3) und EFLAK (T4) gespalten. Auch wenn diese Trypsin-Spaltung unvollständig verläuft, wird dabei immer ein äquimolares Gemisch der Peptide T2-3 und T4 gebildet, so dass sich die Nachweisempfindlichkeiten der beiden Peptide immer direkt vergleichen lassen. Die bei der nanoESI-Analyse erhaltenen Spektren sind in Abbildung 3.18

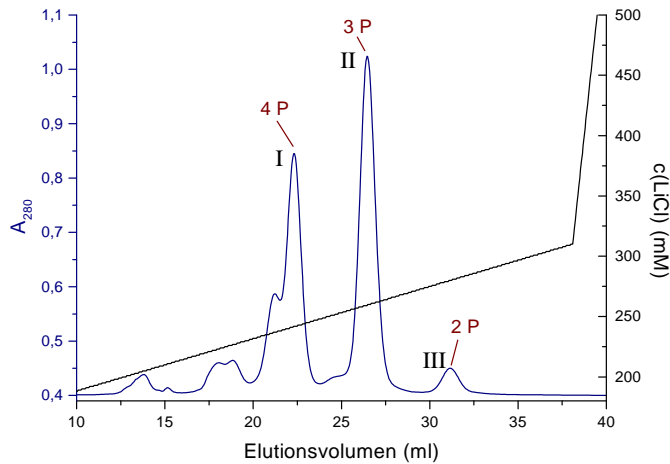


Abbildung 3.16: Kationenaustauscher-Chromatogramm (Mono S) rekindanter PKA C α -Untereinheit. Die Kinase lässt sich in zweifach, dreifach und vierfach phosphoryliertes Protein trennen.

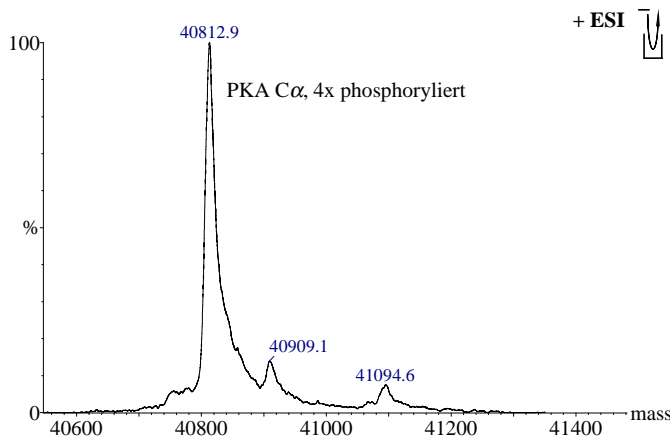


Abbildung 3.17: Dekonvolviertes nanoESI-TOF-Massenspektrum rekindanter, vierfach phosphorylierter PKA C α -Untereinheit. Die experimentell bestimmte mittlere Molekülmasse von 40812,9 Da zeigt gute Übereinstimmung mit dem berechneten Wert von 40808,8 Da.

dargestellt. Wird die Peptidmischung ohne Entsalzung analysiert, dann können beide Peptide, wenn auch mit deutlich unterschiedlicher Empfindlichkeit, detektiert werden. Nach einer Entsalzung mit C₁₈-ZipTips lässt sich nur noch das Peptid T4 nachweisen, das Phosphopeptid T2-3 bindet offenbar nicht an die C₁₈-Phase und geht somit bei der Entsalzung verloren. Alternativ zu den verwendeten C₁₈-ZipTips wurde das gleiche Experiment auch mit einem anderen Reversed-Phase-Material (Oligo R3, PerSeptive Biosystems) durchgeführt, das laut Literatur (Neubauer & Mann, 1999) zur Entsalzung hydrophiler Peptide besser geeignet ist. Aber auch an dieses Chromatographie-Material konnte das phosphorylierte Peptid T2-3 nicht gebunden werden. Der Nachweis des Phosphopeptids nach der Entsalzung gelang nur, wenn bei der Entsalzung ein Ionenpaar-Reagenz, wie beispielsweise TFA verwendet wurde (Daten nicht gezeigt), wobei dann allerdings die Empfindlichkeit der nanoESI-Messung stark beeinträchtigt war.

Ein analoges Experiment wie in Abbildung 3.18 wurde auch mit den Peptiden myrGDA AAAKGSEQSVK und myrGDAAAAGpSEQSVK durchgeführt. Das Ergebnis dieser

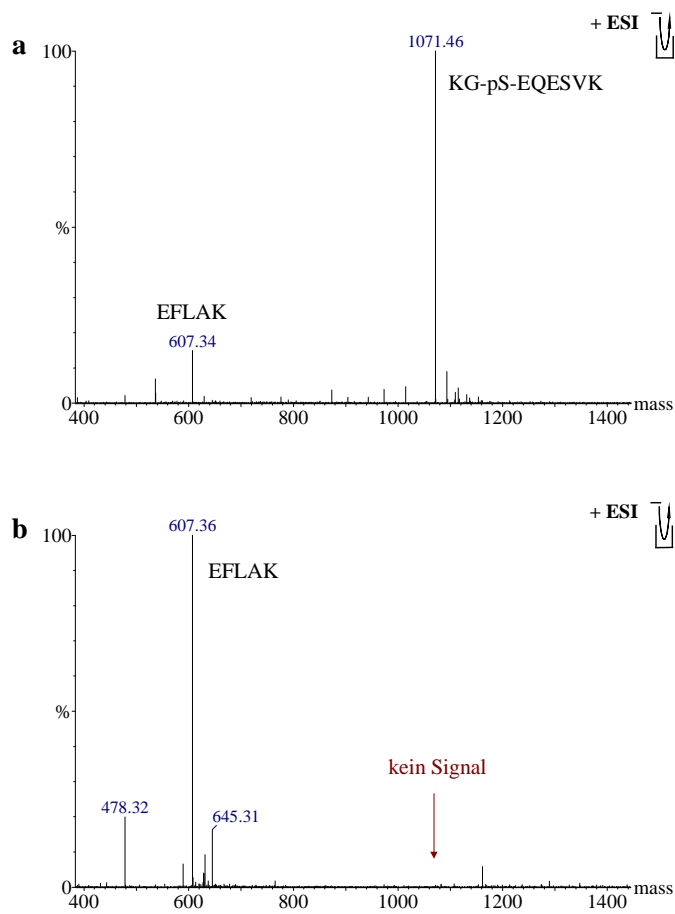


Abbildung 3.18: NanoESI-TOF-Massenspektren einer äquimolaren Mischung der Peptide KGpSEQE SVK und EFLAK, die durch Spaltung des Peptids KGpSEQESVK EFLAK mit Trypsin erzeugt wurde. Die ESI-Spektren wurden mit Hilfe der Software MaxEnt3 (MassLynx) dekonvolviert. a) Dekonvolviertes Massenspektrum ohne Entsalzung; b) dekonvolviertes Massenspektrum nach Entsalzung mit C₁₈-ZipTips. Das Phosphopeptid bindet nicht an die C₁₈-Phase und geht bei der Entsalzung verloren.

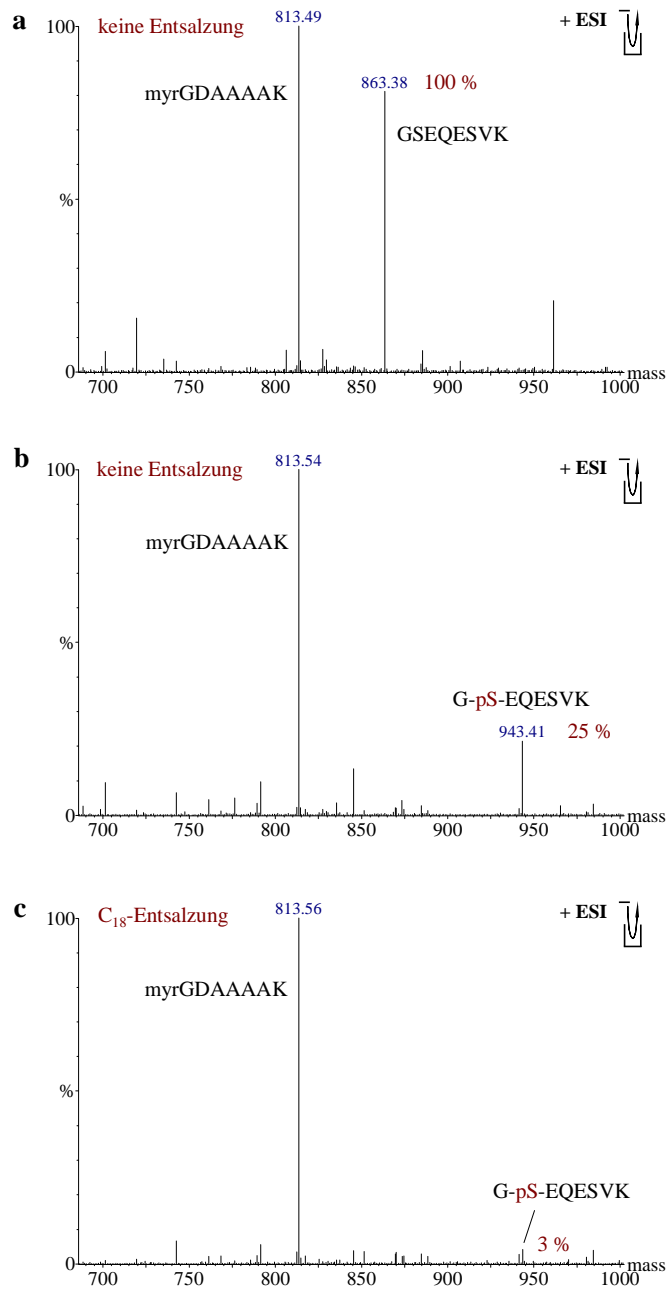


Abbildung 3.19: NanoESI-TOF-Massenspektren äquimolarer Mischungen der Peptide myrGDAAAk und GSEQESVK und der Peptide myrGDAAAk und GpSEQESVK, die durch Spaltung des Peptids myrGDAAAkGSEQESVK bzw. myrGDAAAkGpSEQESVK mit Trypsin erzeugt wurden. Die ESI-Spektren wurden mit Hilfe der Software MaxEnt3 (MassLynx) dekonvolviert. a) Dekonvolviertes Massenspektrum von myrGDAAAk und GSEQESVK ohne Entsalzung; b) dekonvolviertes Massenspektrum von myrGDAAAk und GpSEQESVK ohne Entsalzung; c) dekonvolviertes Massenspektrum von myrGDAAAk und GpSEQESVK nach Entsalzung mit C₁₈-ZipTips.

Experimente ist in Abbildung 3.19 dargestellt. Ein Vergleich zwischen der phosphorylierten und der nicht phosphorylierten Form des Peptids (Abbildung 3.19 a und 3.19 b) macht deutlich, dass die Phosphorylierung einen negativen Einfluss auf die Nachweisempfindlichkeit hat. Das phosphorylierte Peptid zeigt im Vergleich zu der nicht phosphorylierten Form nur noch eine Intensität von 25 %. Nach der Entsalzung des äquimolaren Peptidgemisches mit C₁₈-ZipTips geht das Peptid GpSEQESVK praktisch vollständig verloren (Abbildung 3.19 c).

Im Falle der Ser10-Phosphorylierung konnte eindeutig gezeigt werden, dass das entsprechende tryptische Phosphopeptid bei der Entsalzung verloren geht. Es sind aber auch noch eine ganze Reihe anderer Ursachen denkbar, die zum Verlust eines Phosphopeptids während der Probenvorbereitung führen können: i) hydrophobe Peptide adsorbieren an Gefäßwände oder an die Gelmatrix, ii) Peptide präzipitieren aufgrund ihrer Löslichkeitseigenschaften, iii) Phosphopeptide komplexieren mit Metallen, und iv) Phosphopeptide gehen bei der IMAC verloren, weil sie entweder zu schwach oder zu stark an das Affinitätsmaterial binden. Beim Verdau eines Phosphoproteins mit einer spezifischen Protease wie Trypsin, wird für eine bestimmte Phosphorylierungsstelle in der Regel nur ein Phosphopeptid gebildet. Geht dieses bei der Probenvorbereitung verloren, dann wird die entsprechende Phosphorylierungsstelle nicht erfasst. Beim Verdau mit einer unspezifischen Protease wie Elastase kommt es zur Bildung überlappender Peptide (vgl. Abbildung 3.11), und es besteht eine gute Chance wenigstens eines dieser Peptide nachweisen zu können, was für einen bevorzugten Einsatz der Elastase bei der Analyse der Proteinphosphorylierung spricht.

Elastase-Verdau der C α -Untereinheit der PKA

Eine Coomassie-gefärbte Gelbande mit 4 pmol der vierfach phosphorylierten C α -Untereinheit der PKA wurde im Gel mit DTT reduziert, mit Iodacetamid alkyliert und mit Elastase proteolytisch gespalten. Nach der Extraktion der Elastase-generierten Peptide aus dem Gel wurden die in dem Gemisch enthaltenen Phosphopeptide mittels IMAC angereichert. In Abbildung 3.20 a ist das nanoESI-TOF-Spektrum einer Probe ohne Phosphopeptid-Anreicherung zu sehen, in Abbildung 3.20 b das Spektrum einer Probe mit Phosphopeptid-Anreicherung. Der Vergleich der beiden Spektren macht die gute Selektivität der IMAC deutlich: die Komplexität der Probe wurde durch die Affinitätschromatographie drastisch reduziert, und das Eluat der IMAC enthält fast ausschließlich Phosphopeptide. In Abbildung 3.21 sind Ausschnittsvergrößerungen der gleichen Spektren gezeigt. Der mit P gekennzeichnete Peak des Phosphopeptids TWpTL ist ohne IMAC nicht vom Hintergrund der nicht phosphorylierten Peptide zu unterscheiden, erst nach der Phosphopeptid-Anreicherung ist der Hintergrund so weit reduziert, dass der Phosphopeptid-Peak mit

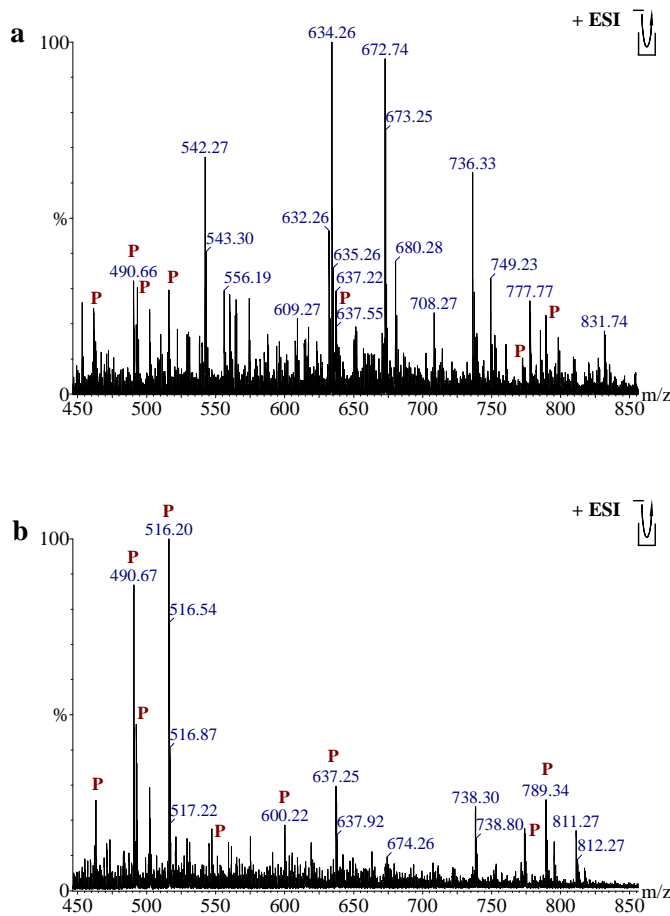


Abbildung 3.20: NanoESI-Massenspektren des Elastase-Verdau vierfach phosphorylierter, rekombinanter PKA C α -Untereinheit. a) TOF-Massenspektrum ohne Anreicherung der Phosphopeptide; b) TOF-Massenspektrum nach Anreicherung der Phosphopeptide mittels IMAC. Durch Phosphopeptide verursachte Peaks sind mit P gekennzeichnet.

seinem Isotopenmuster deutlich zu erkennen ist.

Mit Hilfe des sog. automatischen *MS-to-MS/MS-switching*, dessen Prinzip in Abbildung 3.22 erklärt ist, wurden von allen Peptiden, die durch die Metallaffinitätschromatographie angereichert wurden (Abbildung 3.20 b), Fragmentionen-Spektren akquiriert. Abbildung 3.23 zeigt exemplarisch das Fragmentionen-Spektrum des einfach protonierten Phosphopeptids bei m/z 600.2. Das Peptid zeigt den für pSer- und pThr-phosphorylierte Peptide charakteristischen Neutralverlust von Phosphorsäure (97.98 Da). Aus den auftretenden a-, b- und y-Ionen lässt sich für das Peptid die Sequenz TWpTL bestimmen. Das Fragmentionen-Spektrum enthält außerdem die Information, dass ausschließlich das Thr an Position 3 des Tetrapeptids (Thr197) phosphoryliert ist. Entsprechend dem gezeigten Beispiel ließen sich auch alle anderen im TOF-Spektrum auftretenden Signale eindeutig einer Sequenz aus der PKA zuordnen. In Tabelle 3.2 sind die Sequenzen der identifizierten Phosphopeptide und auch die Sequenzen der nicht phosphorylierten Peptide zusammengefasst. Neben Phosphopeptiden werden bei der IMAC auch sehr saure Peptide angereichert

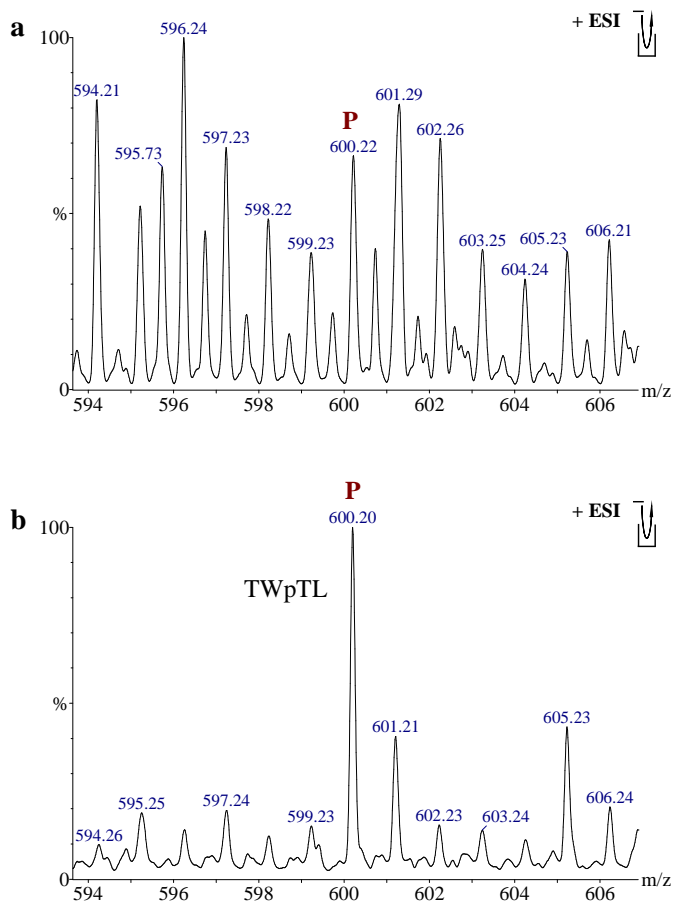


Abbildung 3.21: Ausschnittsvergrößerungen der nanoESI-Massenspektren des Elastase-Verdau vierfach phosphorylierter, rekombinanter PKA C α -Untereinheit. a) TOF-Massenspektrum ohne Anreicherung der Phosphopeptide; b) TOF-Massenspektrum nach Anreicherung der Phosphopeptide mittels IMAC. Der mit P gekennzeichnete Peak des Phosphopeptids TWpTL ist ohne IMAC nicht vom Hintergrund der nicht phosphorylierten Peptide zu unterscheiden, erst nach der Phosphopeptid-Anreicherung ist der Hintergrund so weit reduziert, dass der Phosphopeptid-Peak mit seinem Isotopenmuster deutlich zu erkennen ist.

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der mittels IMAC angereicherten Peptide aus dem Elastase-Verdau von vierfach phosphorylierter, rekombinanter PKA (B = Carbamidomethyl-Cystein).

Phosphopeptide		Nicht phosphorylierte Peptide
GRF-pS-EPHA	(Ser139)	FKGPGDTSNFDDYEEEEI
IGRF-pS-EPHA	(Ser139)	YEEEEI
TW-pT-L	(Thr197)	VDWWAL
KKG-pS-EQESVKEF	(Ser10)	
RV-pS-INEK	(Ser338)	
RV-pS-INEKBGKEF	(Ser338)	
RV-pS-INEKBGKEFSEF	(Ser338)	

oder Peptide, die mehrere His- oder Trp-Reste enthalten (Posewitz & Tempst, 1999). Die Eigenschaft der Elastase überlappende Fragmente zu generieren, zeigt sich besonders deutlich im Falle der Ser338-Phosphorylierung, die anhand von drei Phosphopeptiden unterschiedlicher Größe nachgewiesen werden konnte. Die Phosphorylierung an Ser139 ließ sich durch zwei Phosphopeptide belegen.

Bedeutung der Präzisionsmasse von Elastase-generierten Phosphopeptiden

Der Genauigkeit und Richtigkeit, mit der die Molekülmassen von Elastase-generierten Peptiden bestimmt werden, kommt aufgrund der fehlenden Spaltungsspezifität der Elastase eine besondere Bedeutung zu. Ist die Aminosäuresequenz des analysierten Phosphoproteins bekannt, und werden die Molekülmassen der Peptide mit einer Genauigkeit von ± 20 ppm bestimmt, dann ist die Anzahl möglicher Peptidsequenzen schon alleine durch die Präzisionsmasse stark eingeschränkt. Dies wird in Tabelle 3.3 demonstriert, in der alle theoretisch möglichen Sequenzen aus der C α -Untereinheit der PKA aufgelistet sind, deren berechnete Molekülmasse innerhalb einer Fehlertoleranz von 20 ppm mit einer experimentell bestimmten Molekülmasse übereinstimmen. Eine Massenpräzision von 20 ppm lässt sich bei interner Kalibrierung mit einem Q-TOF-Massenspektrometer routinemäßig erreichen, der durchschnittliche Fehler der in Tabelle 3.3 identifizierten Peptide liegt bei 8 ppm (0.009 Da). Von den im TOF-Spektrum des Eluats der IMAC auftretenden Signalen (Tabelle 3.3, Spalte 1) können mit der gegebenen Massengenauigkeit sechs der insgesamt zwölf Signale alleine anhand ihrer Präzisionsmasse eindeutig zugeordnet werden. Bei den restlichen Signalen ist für die zweifelsfreie Identifikation der Peptidsequenz zusätzlich noch Information aus den Fragmentionen-Spektren der entsprechenden Peptide erforderlich. Da die Auswahl an möglichen Sequenzen durch die hohe Massenpräzision

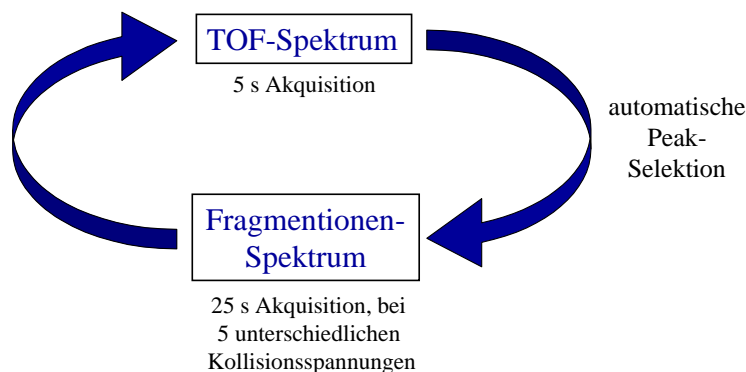


Abbildung 3.22: Schema zum automatischen *MS-to-MS/MS-switching*. Nach der Akquisition eines TOF-Spektrums werden die Signale, von welchen Fragmentationenspektren generiert werden, automatisch ausgewählt, beginnend mit dem intensivsten Signal. Nach 25 Sekunden, in denen ein selektiertes Peptid in Abhängigkeit seines m/z -Wertes bei fünf unterschiedlichen Kollisionsspannungen fragmentiert wird, schaltet das Spektrometer wieder in den MS-Modus zurück, um erneut ein TOF-Spektrum zu akquirieren. Ein einmal selektiertes Signal wird dabei von einer weiteren Selektion ausgeschlossen. Nach diesem Prinzip werden in der Reihenfolge ihrer Intensität von allen im TOF-Spektrum auftretenden Signalen Fragmentationenspektren generiert, bis eine eingestellte Intensitätsschwelle unterschritten wird.

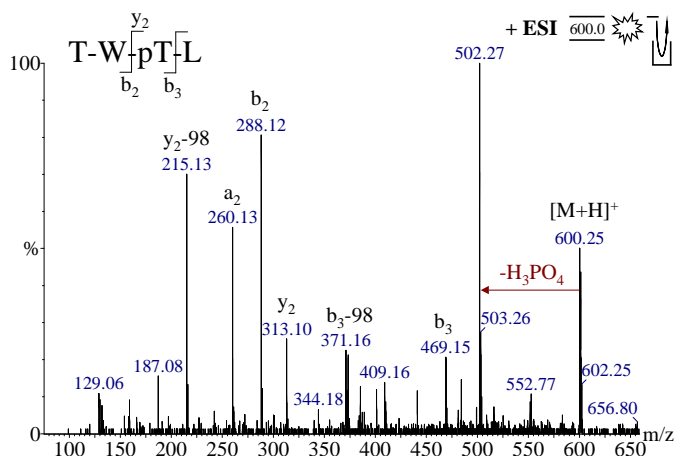


Abbildung 3.23: Automatisch generiertes Fragmentationenspektrum eines aus dem Elastase-Verdau der PKA angereicherten Peptids. Das einfach protonierte Peptid zeigt den für Ser- und Thr-phosphorylierte Peptide charakteristischen Neutralverlust von H_3PO_4 und eine Reihe von a-, b- und y-Ionen, aus welchen sich die Sequenz TWpTL bestimmen lässt.

Tabelle 3.3: Zuordnung der aus dem Elastase-Verdau der Ca-Untereinheit der PKA mittels IMAC angereicherten Peptide. Es sind alle theoretisch möglichen Sequenzen aufgelistet, deren berechnete Molekülmasse innerhalb einer Fehlertoleranz von 20 ppm mit einer experimentell bestimmten Molekülmasse übereinstimmen. Die Zuordnung der richtigen Sequenz (hervorgehoben) erfolgte mit Hilfe von Sequenzdaten.

m/z	expt. M_r	z	calc. M_r	Δm (mDa)	Δm (ppm)	Sequenzen (± 20 ppm)			
600.247	599.240	+1	599.236	+4	+7	TW_pTL			
						pTWTL			
789.402	788.395	+1	788.397	-2	-3	HKWFAT			
			788.386	+9	+11	VDWWAL			
811.320	810.313	+1	810.328	-15	-19	YEEEEI			
463.233	924.452	+2	924.443	+9	+10	RV_pSINEK			
490.703	979.391	+2	979.391	0	0 ^x	GRF_pSEPHA			
547.253	1092.491	+2	1092.489	+2	+2	KLEF _p SFKD			
			1092.475	+16	+15	IGRF_pSEPHA			
738.350	1474.686	+2	1474.671	+15	+10	KKG_pSEQESVKEF			
						KKGSEQ _p SVKEF			
492.562	1474.665	+3	1474.671	-6	-4	KKG_pSEQESVKEF			
						KKGSEQ _p SVKEF			
773.860	1545.705	+2	1545.708	-3	-2	AKKG _p SEQESVKEF			
						AKKGSEQ _p SVKEF			
						1545.702	+3	+2	L _p SKGYNKAVDWW
						1545.701	+4	+3	RV_pSINEKBGKEF
						1545.721	-16	-10	pS _p SDLKDLLRNLL
516.238	1545.693	+3	1545.701	-8	-5	RV_pSINEKBGKEF			
						1545.702	-9	-6	L _p SKGYNKAVDWW
						1545.708	-15	-10	AKKG _p SEQESVKEF
									AKKGSEQ _p SVKEF
						1545.721	-28	-18	pS _p SDLKDLLRNLL
637.293	1908.858	+3	1908.866	-8	-4	IDQQGYIQV _p TDFGFAK			
						1908.844	+14	+7	RV_pSINEKBGKEFSEF
									RVSINEKBGKEF _p SEF
1046.441	2090.867	+2	2090.865	+2	+1	GGEMF _p SHLRRIGRF _p S			
			2090.859	+8	-4	FKGPGDTSNFDDYEEEEI			

B = Carbamidomethyl-Cystein, x = Lock-Masse

schon stark eingeschränkt ist, in dem hier besprochenen Beispiel muss zwischen maximal vier Sequenzen unterschieden werden, ist eine eindeutige Identifizierung der Peptidsequenz auch mit Fragmentionen-Spektren möglich, die nur sehr wenig Sequenzinformation enthalten.

Protein-Identifizierung mit Elastase-generierten Phosphopeptiden

Wird ein unbekanntes Phosphoprotein analysiert, dann ist es nicht möglich, anhand von Präzisionsmassen eine Vorauswahl möglicher Peptidsequenzen zu treffen. Es stellte sich deshalb die Frage, ob es auch möglich ist, ein Phosphoprotein nur anhand der Elastase-generierten Phosphopeptide zu identifizieren. Um diese Frage zu klären, wurde aus den Fragmentionen-Spektren von sieben Elastase-generierten Phosphopeptiden manuell Sequenzinformation extrahiert und zusammen mit den Präzisionsmassen der Phosphopeptide für eine Datenbanksuche mit dem Suchprogramm Mascot (Perkins et al., 1999) eingesetzt. In Abbildung 3.24 ist das Ergebnis dieser Datenbanksuche zu sehen. Die katalytische α -Untereinheit der PKA ist der einzige signifikante Treffer mit einem *Score* von 267 (*Score* > 65 ist signifikant), und alle für die Suche verwendeten Phosphopeptid-Daten konnten richtig zugeordnet werden. Eine Zusammenfassung der Suchdaten und des Suchergebnisses ist in Tabelle 3.4 zu finden. Es konnte damit gezeigt werden, dass es trotz der fehlenden Spaltungsspezifität der Elastase problemlos möglich ist, ein Phosphoprotein anhand von Elastase-generierten Phosphopeptiden eindeutig zu identifizieren. Die Analyse der Proteinphosphorylierung mittels Elastase-Verdau ist somit auch auf Phosphoproteine unbekannter Sequenz anwendbar. Eine Weiterentwicklung der Datenbank-Suchprogramme wird in Zukunft möglicherweise auch die Phosphoprotein-Identifizierung anhand der uninterpretierten Fragmentionen-Spektren von Elastase-generierten Phosphopeptiden zulassen. Diese Art der Suche führte mit den gegebenen Daten nicht zu einem signifikanten Treffer (Daten nicht gezeigt).

Transkriptions-Initiations-Faktor IA (TIF-IA)

Der Transkriptions-Initiations-Faktor IA (TIF-IA) ist ein wichtiges regulatorisches Protein, das die Zellwachstums-abhängige Transkription ribosomaler RNA (rRNA) kontrolliert (Bodem et al., 2000). Durch *in-vivo*- und *in-vitro*-Markierungsexperimente mit radioaktivem ^{32}P konnten Hinweise auf eine kovalente Modifikation des Proteins durch Phosphorylierung erhalten werden. Um die Positionen der Phosphorylierungsstellen des TIF-IA zu charakterisieren, wurde das Protein auf Genebene mit einem sog. *FLAG-Tag* versehen, eine Peptidsequenz, welche die Isolierung des Proteins mittels Antikörper ermöglicht. Das rekombinante Protein wurde in humanen 293T-Zellen exprimiert und mittels Immuno-Präzipitation isoliert. Das auf diese Weise erhaltene Proteingemisch wurde mittels

(MATRIX) Mascot Search Results *(SCIENCES)*

User : Andreas Schlosser
 Email : a.schlosser@dkfz.de
 Search title : Elastase-Verdau PKA - Anreicherung mit IMAC
 Database : SwissProt 40.6 (165372 sequences; 90816009 residues)
 Timestamp : 10 Jan 2002 at 11:13:09 GMT
 Top Score : 267 for P00517, CAMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE, ALPHA-CATALYTIC SUBUNIT

Probability Based Mowse Score

Score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 65 are significant ($p < 0.05$).

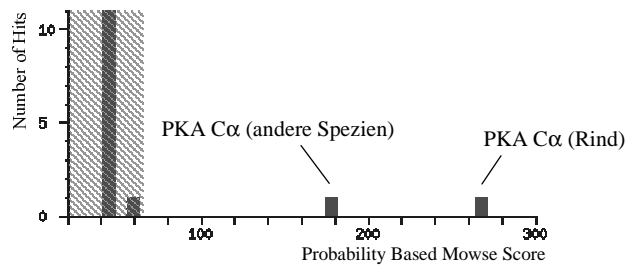


Abbildung 3.24: Zusammenfassung des Ergebnisses der Datenbanksuche mit sieben Elastase-generierten Phosphopeptiden. Neben den Präzisionsmassen der Phosphopeptide wurden für die Suche auch Teilsequenzen, die aus den entsprechenden Fragmentionen-Spektren manuell erhalten wurden, verwendet (Details siehe Tabelle 3.4). Die katalytische α -Untereinheit der PKA ist der einzige signifikante Treffer der Datenbanksuche.

SDS-PAGE aufgetrennt. Die Coomassie-gefärbte Gelbande des TIF-IA wurde aus dem Gel ausgeschnitten und entfärbt, das Protein wurde im Gel mit DTT reduziert, mit Iodacetamid alkyliert und mit Elastase proteolytisch gespalten. Die in dem Elastase-generierten Peptidgemisch enthaltenen Phosphopeptide wurden mittels IMAC angereichert und mit nanoESI-MS und nanoESI-Tandem-MS analysiert. In Abbildung 3.25 ist das TOF-Massenspektrum des Elastase-Verdau des TIF-IA nach der Anreicherung der Phosphopeptide dargestellt. Die mit P gekennzeichneten Peaks konnten im Zuge der nachfolgenden Tandem-MS-Analysen als Phosphopeptide identifiziert werden. Ein Phosphopeptid ließ sich als zweifach und dreifach protoniertes Peptid detektieren (m/z 1154.47 und 796.99), ein zweites Phosphopeptid wurde als dreifach protoniertes Peptid bei m/z 625.00 detektiert. Die automatisch generierten Fragmentionen-Spektren der beiden Phosphopeptide sind in Abbildung 3.26 zu sehen. Abbildung 3.26 a zeigt das Fragmentionen-Spektrum des zweifach protonierten Phosphopeptids bei m/z 1154.47, das durch eine Prolin-induzierte Fragmentierung charakterisiert ist. Diese führt zur Bildung der beiden komplementären Fragmente

Tabelle 3.4: Zusammenfassung der Datenbanksuche mit sieben Elastase-generierten Phosphopeptiden. Zur Suche wurden die Präzisionsmassen der Peptide und aus den Fragmentionen-Spektren extrahierte Sequenzinformation verwendet. Mascot-Suchparameter: Proteindatenbank: SwissProt (ohne Speziesbeschränkung), Spaltungsspezifität: keine, Peptid-Fehlertoleranz: ± 0.05 Da, variable Modifikationen: Phosphorylierung an Ser oder Thr, Carbamidomethylierung an Cys. Alle Suchdaten konnten mit Phosphopeptidsequenzen aus der PKA C α -Untereinheit korreliert werden (vgl. auch Abb. 3.21).

Mascot-Suchdaten		Mascot-Suchergebnis	
expt. M _r	Teilsequenzen	calc. M _r	identifizierte Peptide
599.240	seq(n-TWTL)	599.24	TWTL + 1P
924.452	seq(c-K) seq(b-NE)	924.44	RVSINEK + 1P
979.391	seq(*-EP)	979.39	GRFSEPHA + 1P
1092.491	seq*-EP)	1092.48	IGRFSEPHA + 1P
1474.686	seq(c-ESVKEF)	1474.67	KKGSEQESVKEF + 1P
1545.705	seq(c-KEF) seq(b-EQ[K])	1545.70	RVSINEKKBGKEF + 1P
1908.858	seq(n-RVSINE)	1908.84	RVSINEKKBGKEFSEF + 1P

y_2 und b_{18} bzw. b_{18}^{2+} . Diese Fragmentierung wird so leicht induziert, dass das zweifach protonierte b_{18} -Ion schon im TOF-Spektrum (m/z 1061.94) zu detektieren ist. Sowohl das einfach als auch das zweifach protonierte b_{18} -Ion zeigen ebenso wie das Moleküllion einen sequentiellen Neutralverlust von zwei Molekülen Phosphorsäure, was eine zweifache Phosphorylierung des Peptids an Ser oder Thr beweist. Zusätzlich zu diesen Fragmenten enthält das Spektrum noch eine kurze y -Ionen- und eine längere b -Ionen-Serie. Mit Hilfe dieser Informationen und der Aminosäuresequenz des TIF-IA konnte für das Phosphopeptid die Sequenz IKEGDVDVpSDpSDDEDNLPA bestimmt werden. Die Phosphorylierungsstellen innerhalb dieses Peptids sind auch ohne weitere Informationen aus dem Fragmentionen-Spektrum eindeutig festgelegt, da das Peptid nur zwei Ser und kein Thr enthält. Das Fragmentionen-Spektrum des dreifach protonierten Phosphopeptids bei m/z 624.00 in Abbildung 3.26 b weist ebenfalls einen Neutralverlust von Phosphorsäure auf. Mit Hilfe der in diesem Spektrum zusätzlich vorhandenen b - und y -Ionen konnte für dieses Phosphopeptid die Sequenz RALENDFFNpSPPRKT bestimmt werden. Die Position der Phosphorylierungsstelle geht aus den Daten des Fragmentionen-Spektrums eindeutig hervor.

Mit den Sequenzinformationen aus den Fragmentionen-Spektren der beiden Phosphopeptide und deren Präzisionsmassen wurde eine Datenbanksuche mit dem Suchprogramm

Tabelle 3.5: Identifizierung der aus dem Elastase-Verdau des TIF-IA mittels IMAC angereicherten Phosphopeptide. Die Identifizierung erfolgte mit Hilfe der Präzisionsmassen und den Sequenzdaten aus den Fragmentionen-Spektren.

m/z	expt. M_r	z	calc. M_r	Δm (mDa)	Δm (ppm)	identifizierte Phosphopeptide
1154.430	2306.845	+2	2306.835	+10	+4	IKEGDVDVpSDpSDEDDNLPA (Ser170, Ser172)
769.949	2306.825	+3	2306.835	-10	-4	IKEGDVDVpSDpSDEDDNLPA (Ser170, Ser172)
624.627	1870.859	+3	1870.873	-14	-7	RALENDFFNpSPPRKT (Ser44)

Mascot initiiert. Wie im Falle der $C\alpha$ -Untereinheit der PKA (vgl. Abbildung 3.24), war auch hier eine eindeutige Identifizierung des Phosphoproteins anhand der Elastase-generierten Phosphopeptide möglich. Der TIF-IA war der einzige signifikante Treffer im Ergebnis der Datenbanksuche (*Score* 83, *Score* ≥ 71 ist signifikant).

Zusammenfassend sind in Tabelle 3.5 die beiden identifizierten Phosphopeptide zusammen mit ihren Präzisionsmassen und den Fehlern aufgelistet. Durch die angewandte Kombination aus Elastase-Verdau, IMAC und Q-TOF-Tandem-Massenspektrometrie konnten im TIF-IA die bis dahin unbekanntenen Phosphorylierungsstellen Ser44, Ser170 und Ser172 identifiziert werden. Ser44 ist in einer Konsensus-Sequenz der *cdc2*-Kinase (S/T-P-X-R/K) (Kennelly & Krebs, 1991) lokalisiert, eine Kinase, die bei der Regulation des Zellzyklus eine wichtige Rolle spielt. Die Regulation der TIF-IA-Aktivität durch eine *cdc2*-Kinase-vermittelte Phosphorylierung könnte somit einen Mechanismus zur Regulation der Zellzyklus-abhängigen rRNA-Synthese darstellen. Sowohl Ser170, als auch Ser172 sind Bestandteil einer Konsensus-Sequenz der *ck2*-Kinase (S/T-X-X-D/E).

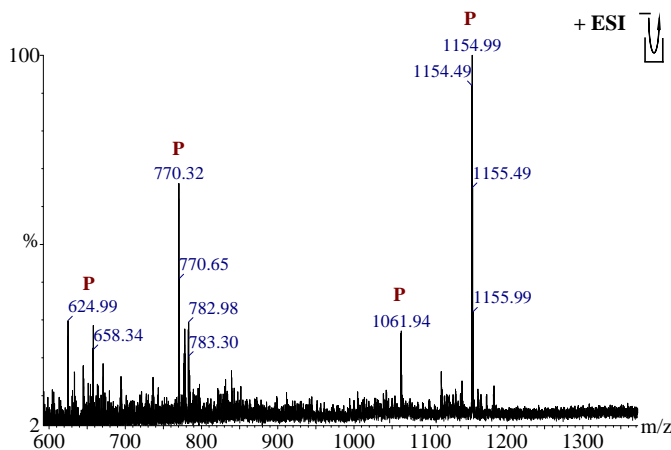


Abbildung 3.25: NanoESI-TOF-Massenspektrum des Elastase-Verdau des TIF-IA nach der Anreicherung der Phosphopeptide mittels IMAC. Durch Phosphopeptide verursachte Peaks sind mit P gekennzeichnet.

Kapitel 4

Analyse kovalenter Proteinmodifikationen

4.1 Einleitung

Die Massenspektrometrie ist eine gut geeignete Methode zur Analyse kovalenter Proteinmodifikationen, da mit Ausnahme von Isomerisierungen, wie der Iso-Aspartat-Bildung, und Razemisierungen kovalente Modifikationen zu einer Änderung der Molekülmasse führen. Die Massendifferenz, die durch eine Modifikation verursacht wird, ist ein wichtiges Kriterium bei der massenspektrometrischen Analyse kovalenter Modifikationen. Eine Liste mit Massendifferenzen bekannter Proteinmodifikationen (Delta Mass) steht im Internet unter <http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/DeltaMass.html> zur Verfügung. Häufig auftretende Massendifferenzen sind beispielsweise - 18 Da (Succinimid-Bildung), - 2 Da (Disulfidbrücken-Bildung), + 1 Da (Desamidierung von Asparagin), + 14 Da (Methylierung), + 16 Da (Methionin-Oxidation), + 28 Da (Formylierung), + 42 Da (Acetylierung), + 80 Da (Phosphorylierung), + 162 Da (Glycosylierung), + 176 Da (Glucuronylierung) + 204 Da (Farnesylierung), + 210 Da (Myristoylierung) oder + 238 Da (Palmitoylierung).

Modifizierte Peptide bilden bei kollisionsinduzierter Fragmentierung häufig spezifische Fragmentationen, die neben der charakteristischen Massendifferenz ebenfalls wichtige Indizien für kovalente Modifikationen liefern können. So bilden beispielsweise myristoylierte Peptide Fragmentationen bei m/z 211.21 (b_0), m/z 240.23 (a_1) und m/z 268.23 (b_1) und Tyrosophosphorylierte Peptide bilden ein Phosphotyrosin-Immonium-Ion bei m/z 216.04. Andere Peptide zeigen einen spezifischen Neutralverlust, wie beispielsweise Ser- und Thr-phosphorylierte Peptide (Neutralverlust von H_3PO_4), glykosylierte Peptide (Neutralverlust des Kohlenhydratanteils), sulfatierte Peptide (Neutralverlust von SO_3) oder Methionin-oxidierte Peptide (Neutralverlust von H_3C-SHO). Diese Neutralverluste lassen sich ebenso

wie spezifische Fragmentationen zur selektiven Detektion der entsprechend modifizierten Peptide mit Hilfe der Tandem-MS nutzen. Die Tandem-MS mit Hochauflösung erlaubt die Unterscheidung von Modifikationen, die eine nahezu gleiche Massendifferenz verursachen, wie beispielsweise Phosphorylierung (+ 79.9663 Da) und Sulfatierung (+ 79.9568 Da) (Rappsilber et al., 2001). Die Identifizierung von Strukturisomeren wie Aspartat und Iso-Aspartat basiert auf einer quantitativ reproduzierbaren Detektion spezifischer Fragmentationen (Lehmann et al., 2000b; Kinzel et al., 2000).

Eine posttranslationale Modifikation von besonderer biologischer Bedeutung ist die Phosphorylierung, deren Analyse mittels massenspektrometrischer Methoden ausführlich in Kapitel 3 behandelt wird. Eine kovalente Modifikation, die ebenfalls eine große biologische Relevanz besitzt ist die Proteinglykosylierung, die bei der Mehrzahl der integralen Membranproteine und der Mehrzahl der segregierten Proteine vorzufinden ist. Die vollständige Charakterisierung eines Glykoproteins umfasst neben der exakten Lokalisierung der Glykosylierungsstelle auch die detaillierte Charakterisierung des Kohlenhydratanteils (Identifizierung der einzelnen Saccharide, Bestimmung der Verknüpfungen und Verzweigungen und Bestimmung der Konfigurationen der anomeren Kohlenstoffe) und stellt somit eine ausgesprochen komplexe Aufgabenstellung dar, die nicht immer alleine mit massenspektrometrischen Methoden lösbar ist. Für die selektive Identifizierung von O-gekoppelten und N-gekoppelten Oligosacchariden in Glykoproteinen wurden eine Reihe unterschiedlicher MS-basierender Methoden entwickelt. Sie beinhalten zumeist die Anwendung unterschiedlicher Proteasen (z.B. Endoprotease Asp-N) und Glykosylasen (z.B. PNGase F) und kombinieren unterschiedliche Trenntechniken wie HPLC (Carr et al., 1993) oder CE (Liu et al., 2001; Zamfir & Peter-Katalinic, 2001) mit MS oder Tandem-MS. Eine auf FTICR-MS basierende Strategie umgeht die Anwendung von Enzymen und die Kopplung von Trenntechniken und nutzt zwei komplementäre Fragmentierungstechniken, die *Electron Capture Dissociation* (ECD) und *Infrared Multiphoton Dissociation* (IRMPD), zur Lokalisation der Glykosylierungsstelle und zur Strukturaufklärung des Kohlenhydratanteils (Hakansson et al., 2001). Glykopeptide mit einem hohen Kohlenhydratanteil lassen sich von unmodifizierten Peptiden auch anhand ihrer Präzisionsmasse unterscheiden (Lehmann et al., 2000a), die aufgrund des hohen Sauerstoffanteils (Atommasse $^{16}\text{O} = 15.9949$) signifikant niedriger als bei nicht modifizierten Peptiden liegt. Eine weitere Strategie nutzt unspezifische Proteasen, um Glykopeptide von anderen Peptiden zu unterscheiden (Juhász & Martin, 1997).

Neben der Phosphorylierung und der Glykosylierung wurden bis dato auch eine große Anzahl anderer kovalenter Proteinmodifikationen mit massenspektrometrischen Methoden analysiert, beispielsweise die Nitrierung an Tyrosin-Resten (Jiao et al., 2001; Petersson et

al., 2001), die Sulfatierung von Tyrosin-Resten (Rappsilber et al., 2001), die Oxidation von Cystein zu Sulfin- bzw. Sulfensäure (Murakami et al., 2000), die Modifikation von Cystein durch Glutathion (Naito et al., 1999; Sogaard et al., 1993), die N-terminale Modifikation von rekombinanten Proteinen mit Gluconsäure (Geoghegan et al., 1999), das Auftreten von N^G, N^G -Dimethyl-Arginin bei einem Protein des Zellkerns (Yague et al., 2000), das Auftreten von γ -Carboxyglutamat (Kelleher et al., 1999) und viele mehr. Alle diese Arbeiten basieren auf dem proteolytischen Verdau der entsprechenden Proteine und einer mehr oder weniger gezielten Suche nach modifizierten Peptiden in den generierten Peptidgemischen. Diese Strategie besitzt zwei grundlegende Nachteile: (i) beim sog. *peptide mapping* wird, vor allem beim In-Gel-Verdau von Proteinen, nur eine Sequenzabdeckung weit unterhalb von 100 % erreicht, wie sie für eine vollständige Charakterisierung aller Modifikationen notwendig ist. (Eine etwas bessere Sequenzabdeckung läßt sich erreichen, wenn das intakte Protein durch Elektroblothing aus dem Gel eluiert und in Lösung verdaut wird (Jonsson et al., 2001)). (ii) Die Suche nach Peptiden mit unbekanntem Modifikationen im Peptidgemisch eines Protein-Verdau ist wenig zielgerichtet und sehr zeitintensiv. Eine Strategie, die diese beiden Nachteile zu umgehen sucht, ist die sog. „Top-Down“-Analyse (Kelleher et al., 1997; Kelleher, 2000), bei der zunächst die Molekülmasse des intakten Proteins ermittelt wird, eine Information, die bei der Charakterisierung von Proteinmodifikation von großem Wert ist. Vergleicht man die aus der Aminosäuresequenz des Proteins berechnete Molekülmasse mit der experimentell ermittelten Molekülmasse, dann entspricht die Differenz dieser beiden Werte der Summe aller kovalenten Modifikationen dieses Proteins. Diese Massendifferenz gibt oft schon wichtige Hinweise auf die Art der vorhandenen Modifikationen. Im nächsten Schritt einer „Top-Down“-Analyse versucht man dann die Position der Modifikation(en) auf eine effektive Art und Weise grob zu lokalisieren, indem man zunächst möglichst große Proteinfragmente generiert. Diese lassen sich z.B. durch eine BrCN-Spaltung oder durch eine partielle Proteolyse erzeugen. Alternativ erlaubt die Anwendung der ESI-FT-MS in Kombination mit ECD eine informative Fragmentierung von intakten Proteinen (Horn et al., 2000; Forbes et al., 2001; Ge et al., 2002) und umgeht somit die Notwendigkeit einer proteolytischen Spaltung; ein entsprechendes Konzept wurde auch für Quadrupol-Ionenfallen in Kombination mit CID entwickelt (Stephenson & McLuckey, 1998). Der Vorteil der „Top-Down“-Strategie im Gegensatz zur gebräuchlichen „Bottom-Up“-Strategie ist die gezielte Vorgehensweise und die zuverlässige Erfassung aller kovalenten Modifikationen. Problematisch ist die Anwendung der „Top-Down“-Strategie bei Proteinen, die mittels Gelelektrophorese getrennt wurden. Es gibt zwar Methoden zur Extraktion von intakten Proteinen aus Polyacrylamidgelen (Schuhmacher et al., 1996; Cohen & Chait, 1997; Ehring et al., 1997; Yefimov et al., 2000), diese sind aber in ih-

rer Effektivität, vor allem bei größeren oder hydrophoben Proteinen, begrenzt. Mögliche Alternativen, mit denen eine SDS-Gelelektrophorese umgangen werden kann, sind die Kapillarelektrophorese (CE) oder eine zweidimensionale Chromatographie (Ionentauscher in Kombination mit Umkehrphasen-Chromatographie).

4.2 Kovalente Modifikationen der PKA

Die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) aus Rinderherz ist ein auf molekularer Ebene sehr gut untersuchtes Protein. Die beiden Phosphorylierungsstellen an Thr197 und Ser338 wurden schon 1979 nachgewiesen (Shoji et al., 1979). Wenige Jahre später konnten Carr et al. zeigen, dass das Enzym N-terminal durch Myristinsäure modifiziert ist (Carr et al., 1982). 1998 wurde von Jedrzejewski et al. eine weitere posttranslationale Modifikation der katalytischen Untereinheit der PKA nachgewiesen, die Desamidierung an Asn2 (Jedrzejewski et al., 1998). Diese kovalente Modifikation beeinflusst die subzelluläre Lokalisation der PKA, die desamidierte Form mit Asp2 ist bevorzugt im Cytoplasma lokalisiert, die unmodifizierte Form mit Asn2 bevorzugt im Zellkern (Pepperkok et al., 2000).

PKA aus Rinderherz

Die katalytische Untereinheit der PKA wurde aus Rinderherz mittels Affinitäts-Chromatographie isoliert (Olsen & Uhler, 1989). Durch Kationenaustauscher-Chromatographie lassen sich die desamidierte Form (Asp2) und die nicht desamidierte Form (Asn2) der PKA auftrennen (Kinzel et al., 1987). In Abbildung 4.1 ist ein entsprechendes Kationenaustauscher-Chromatogramm zu sehen. Bei der dargestellten Trennung wurden zwei zusätzliche Peaks (A1 und B1), die bislang nicht beschrieben wurden, detektiert. Diese Peaks wurden fraktioniert und mittels nanoESI-MS analysiert. Die Spektren für Peak A1 und A2 sind in Abbildung 4.2 dargestellt. Die experimentell bestimmten relativen Molekülmassen der Proteine aus Peak A2 (40860) und aus Peak B2 (40862) stimmen mit der berechneten Molekülmasse für die bovine katalytische α -Untereinheit der PKA (40859) überein, wenn man die bekannten kovalenten Modifikationen (Myristoylierung und zweifache Phosphorylierung) berücksichtigt. Die Proteine aus den Peaks A1 und B1 tragen eine weitere kovalente Modifikation, die zu einer 305 Da größeren Molekülmasse führt. Um die Identität und die Position dieser Modifikation zu bestimmen, wurden die beiden Proteine aus Peak A1 und Peak A2 mit der Endoproteinase AspN gespalten. Ein Vergleich der entsprechenden Massenspektren ließ eine Lokalisierung der Modifikation in dem C-terminalen Peptid DYEEEEIRVpSINEKCGKEFSEF zu. Eine kovalente Proteinmodifikation, die eine Massendifferenz von 305 Da verursacht, ist die Modifizierung eines Cysteins durch Gluta-

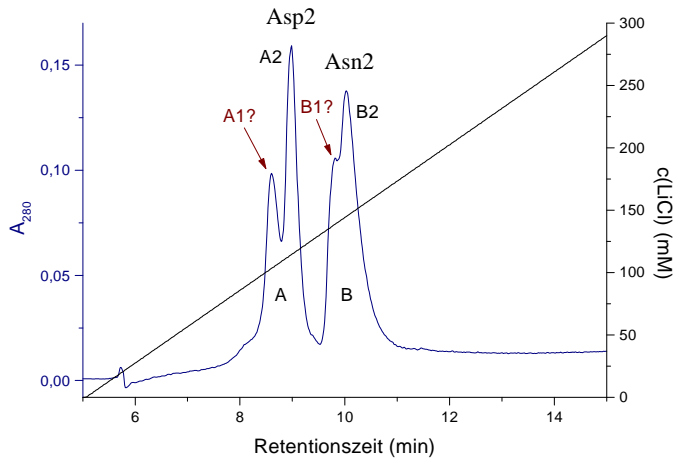


Abbildung 4.1: Kationenaustauscher-Chromatogramm (Mini S) der aus Rinderherz isolierten katalytischen Untereinheit der PKA. Die Kinase lässt sich in die desamidierte (Peak A) und die nicht desamidierte Form (Peak B) auftrennen.

thion. Glutathion ist das Tripeptid γ -Glu-Cys-Gly (siehe Abbildung 4.3). Glutathion ist in praktisch allen Zellen in millimolarer Konzentration enthalten und dient als intrazellulärer Redoxpuffer. Da Glutathion über eine Disulfidbrücke mit dem Cystein des Proteins verknüpft ist, ist diese Modifikation durch Reduktionsmittel reversibel, und entsprechend verschwinden die beiden zusätzlichen Peaks A1 und B1 nach einer Inkubation mit DTT aus dem Chromatogramm. Abbildung 4.4 fasst die im AspN-Verdau der PKA identifizierten Peptide noch einmal zusammen. Neben der Glutathion-Modifikation an Cys343 lassen sich in dem AspN-Verdau auch die N-terminale Myristoylierung und die Phosphorylierung an Thr197 und an Ser338 nachweisen.

Rekombinante $C\alpha$ -Untereinheit

Bei der Expression der katalytischen α -Untereinheit der PKA in *e. coli* kommt es zu einer katalytischen Autophosphorylierung des Enzyms an Ser10, Ser139, Thr197 und an Ser338 (Toner-Webb et al., 1992), und es bildet sich ein Gemisch aus zweifach, dreifach und vierfach phosphoryliertem Protein. Diese unterschiedlichen Phosphorylierungsstufen der PKA lassen sich mittels Kationenaustauscher-Chromatographie (Mono S) trennen (Herberg et al., 1993). Abbildung 4.5 zeigt ein solches Kationenaustauscher-Chromatogramm, bei dem neben den bekannten Peaks der unterschiedlichen Phosphorylierungsstufen (Peak I - III) noch weitere Peaks auftraten (Peak Ia - Ic). Die Fraktionen aller Peaks wurden mittels nanoESI-MS analysiert. Die experimentell bestimmten relativen Molekülmassen sind Abbildung 4.5 zu entnehmen. Exemplarisch sind in Abbildung 4.6 die dekonvolutierte TOF-Massenspektren der Proteine aus Peak Ic und Peak II dargestellt. Um die kovalente Modifikation, die zu der beobachteten Massendifferenz von 179 Da führt, zu lokalisieren, wurde eine BrCN-Spaltung der unterschiedlich modifizierten Proteine durchgeführt. In Abbildung 4.7 ist ein Ausschnitt aus dem entsprechenden nanoESI-

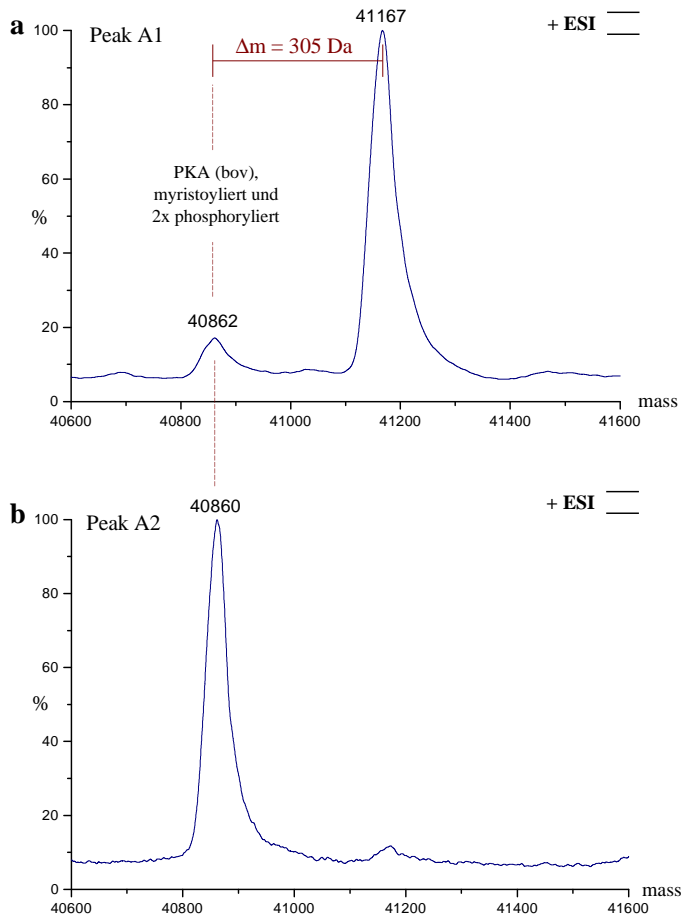
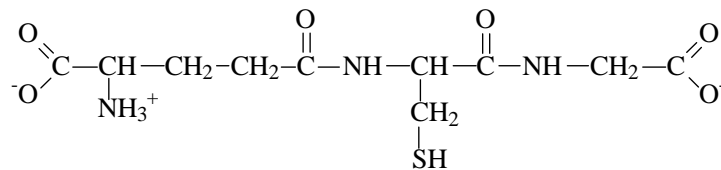


Abbildung 4.2: Dekonvolutierte nanoESI-Massenspektren von a) Peak A1 und b) Peak A2. Die experimentell bestimmte Molekülmasse des Proteins aus Peak A2 stimmt mit der berechneten Molekülmasse für die bovine katalytische α -Untereinheit der PKA überein, wenn man die bekannten kovalenten Modifikationen berücksichtigt. Die experimentell bestimmte Molekülmasse des Proteins aus Peak A1 liegt 305 Da höher.



γ -Glu-Cys-Gly

Abbildung 4.3: Strukturformel von Glutathion (γ -Glu-Cys-Gly). Das Glutamat ist über seine γ -Carboxylatgruppe mit der Aminogruppe des Cysteins verknüpft.

D1 myr-GNAAAAKKGSEQESVKEFLAKAKE
 D2 DFLKKWENPAQNTAHL
 D3 DQFERIKTLGTGSFGRVMLVKHMETGNHYAMKIL
 D4 DKQKVVKLKQIEHTLNEKRILQAVNFPFLVKLEFSFK
 D5 DNSNLYMVM EYVPGGEMFSLRRIGRFSEPHARFYAAQIVLTFEYLHSL
 D6 DLIYR
 D7 DLKPENLLI
 D8 DQQGYIQVT
 D9 DFGFAKRVKGRTW-pT-LCGTPEYLAPEIILSKGYNKAV
 D10 DWWALGVLIYEMAAGYPPFFA
 D11 DQPIQIYEKIVSGKVRFP SHFSS
 D12 DLK
 D13 DLLRNLLQV
 D14 DLTKRFGNLKNGVN
 D15 DIKNHKWFATT
 D16 DWIAIYQRKVEAPFIPKFKGPG
 D17 DTSNF
 D18 D
 D19 DYEEEEIRV-pS-INEK-GlutC-GKEFSEF

Abbildung 4.4: AspN-generierte Peptide (D1 bis D19) der katalytischen α -Untereinheit der PKA. Die blau markierten Sequenzen ließen sich im entsprechenden nanoESI-Spektrum detektieren. Bis auf die Peptide D11-D15 und D18-D19 waren alle Peptide vollständig gespalten. Die Sequenzabdeckung des AspN-Verdau ist 68 %, alle kovalenten Modifikationen des Proteins ließen sich im AspN-Verdau nachweisen.

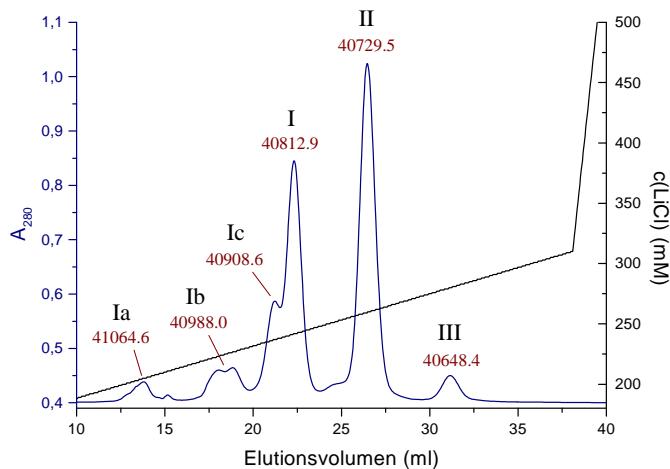


Abbildung 4.5: Kationenaustauscher-Chromatogramm (Mono S) rekombinanter PKA C α -Untereinheit. Die Kinase lässt sich in zweifach, dreifach und vierfach phosphoryliertes Protein trennen. Darüber hinaus lassen sich noch weitere Formen detektieren, die unterschiedlich kovalent modifiziert sind. Die experimentell ermittelten relativen Molekülmassen der unterschiedlich modifizierten Formen sind angegeben.

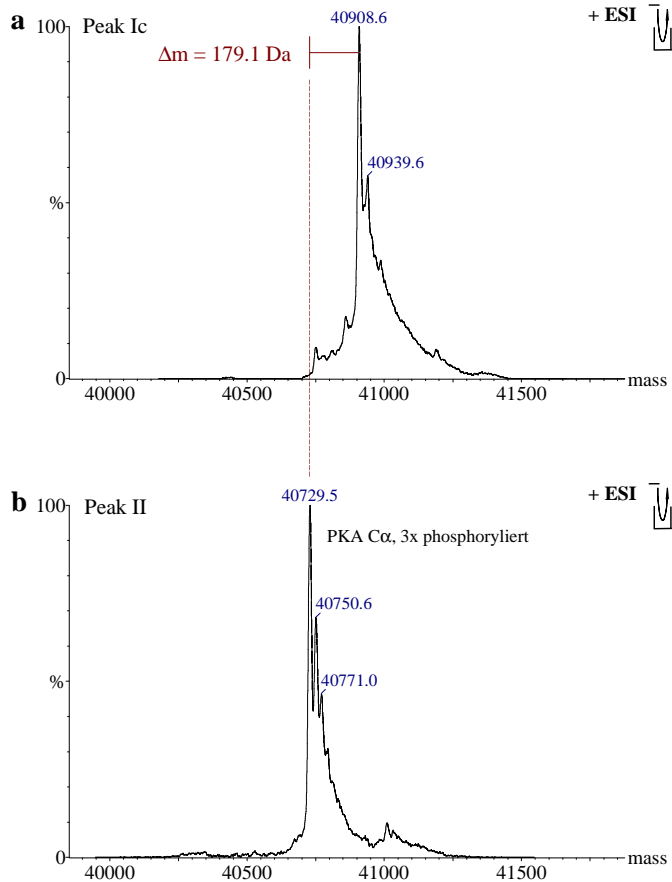


Abbildung 4.6: Dekonvolutierte nanoESI-Massenspektren von a) Peak Ic und b) Peak II. Die experimentell bestimmte Molekülmasse des Proteins aus Peak II stimmt mit der berechneten Molekülmasse für die dreifach phosphorylierte katalytische α -Untereinheit der PKA überein. Die experimentell bestimmte Molekülmasse des Proteins aus Peak Ic liegt 179 Da höher.

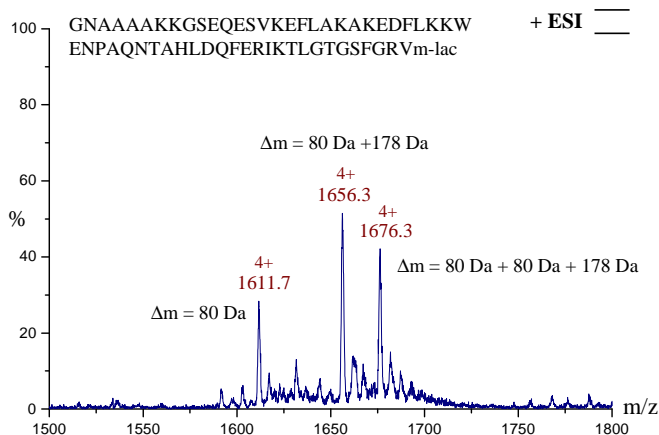


Abbildung 4.7: Ausschnitt aus dem nanoESI-Spektrum der BrCN-Spaltung der rekombinanten katalytischen α -Untereinheit der PKA. Das Spektrum zeigt das vierfach protonierte N-terminale Peptid in unterschiedlich modifizierten Formen. Durch die Spaltung mit BrCN wird aus dem C-terminalen Met ein Homoserin-lacton (m-lac) gebildet.

Spektrum dargestellt, der das vierfach protonierte N-terminale Peptid in unterschiedlich modifizierter Form zeigt. Neben der erwarteten Phosphorylierung an Ser10 ($\Delta m = 80$ Da) lässt sich auch die Modifikation, die zu einer zusätzlichen Massendifferenz von 178 Da führt ($\Delta m = 80$ Da + 178 Da), im N-terminalen Peptid lokalisieren. Darüberhinaus findet sich noch eine dritte Variante des N-terminalen Peptids mit einer Massendifferenz von insgesamt 338 Da ($\Delta m = 80$ Da + 80 Da + 178 Da). Die beobachteten Molekülmassen lassen sich mit einer N-terminalen Modifikation erklären, die 1999 zum ersten Mal in der Literatur beschrieben wurde, der Modifikation der N-terminalen Aminogruppe eines Proteins durch Gluconsäure bzw. Phosphogluconsäure (Geoghegan et al., 1999). Die Autoren dieser Publikation beschreiben die Identifizierung der N-terminalen Gluconsäure-Modifikation mit unterschiedlichen massenspektrometrischen und NMR-spektroskopischen Untersuchungen. Darüber hinaus wird von den Autoren auch ein Mechanismus diskutiert, der die Modifizierung mit Gluconsäure bzw. Phosphogluconsäure plausibel erklärt (siehe Abbildung 4.8). Demnach führt die nicht-enzymatische Acylierung der N-terminalen Aminogruppe eines in der Bakterienzelle exprimierten Proteins durch 6-Phosphoglucono-1,5-lacton, das als reaktives Zwischenprodukt im Pentosephosphatweg gebildet wird, zur Modifikation mit Phosphogluconsäure. Die enzymatische Dephosphorylierung durch eine bakterielle Phosphatase erklärt die Bildung der Gluconsäure-Modifikation.

Somit lassen sich alle experimentell bestimmten Molekülmassen der unterschiedlichen Fraktionen (siehe Abbildung 4.5) erklären. Es finden sich die folgenden modifizierten Formen der PKA: fünffach phosphoryliert und Gluconsäure-modifiziert (calc. $M_r = 41066$, Peak Ia), vierfach phosphoryliert und Gluconsäure-modifiziert (calc. $M_r = 40986$, Peak Ib), dreifach phosphoryliert und Gluconsäure-modifiziert (calc. $M_r = 40906$, Peak Ic), vierfach phosphoryliert (calc. $M_r = 40808$, Peak I), dreifach phosphoryliert (calc. $M_r = 40728$, Peak II) und zweifach phosphoryliert (calc. $M_r = 40648$, Peak III).

Das Auftreten unterschiedlich modifizierter Formen der PKA ist von den Expressionsbedingungen abhängig. Bei einer Expression der katalytischen α -Untereinheit trat eine weitere, bislang nicht charakterisierte Variante der PKA auf. Die experimentell bestimmte Molekülmasse des intakten Proteins war mit einem fünffach phosphorylierten Protein kompatibel. Um die unbekannte Phosphorylierungsstelle zu lokalisieren, wurde das Protein mit Trypsin gespalten und mittels MS und Tandem-MS analysiert. Im Neutralverlust-Scan wurde ein zweifach protoniertes Phosphopeptid bei m/z 622.9 detektiert (Daten nicht gezeigt). Das entsprechende Fragmentationenspektrum dieses Phosphopeptids ist in Abbildung 4.9 dargestellt. Das Peptid zeigt den für Ser/Thr-phosphorylierte Peptide charakteristischen Neutralverlust von Phosphorsäure. Mit Hilfe der sequenzspezifischen b- und y-Ionen lässt sich das Peptid in der Sequenz der katalytischen α -Untereinheit der PKA

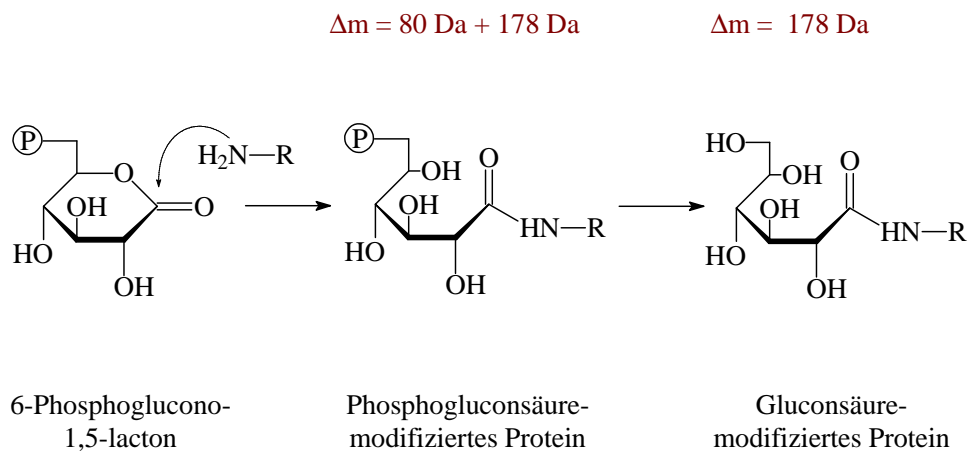


Abbildung 4.8: Postulierter Mechanismus für die N-terminale Modifizierung von Proteinen durch Gluconsäure und Phosphogluconsäure nach Geoghegan et al. (Geoghegan et al., 1999). 6-Phosphoglucono-1,5-lacton ist ein reaktives Zwischenprodukt des Pentosephosphatweges, das zur nicht-enzymatischen Acylierung der N-terminalen Aminogruppe eines Proteins führen kann. Das Phosphogluconsäure-modifizierte Protein kann dann durch eine bakterielle Phosphatase dephosphoryliert werden.

eindeutig identifizieren, die Phosphorylierungsstelle lässt sich an Position 259 lokalisieren. Diese Phosphorylierungsstelle ist mit einer Autophosphorylierung kompatibel, da sie innerhalb einer Konsensus-Sequenz der PKA (K/R-X₁₋₂-S/T) (Kennelly & Krebs, 1991) liegt.

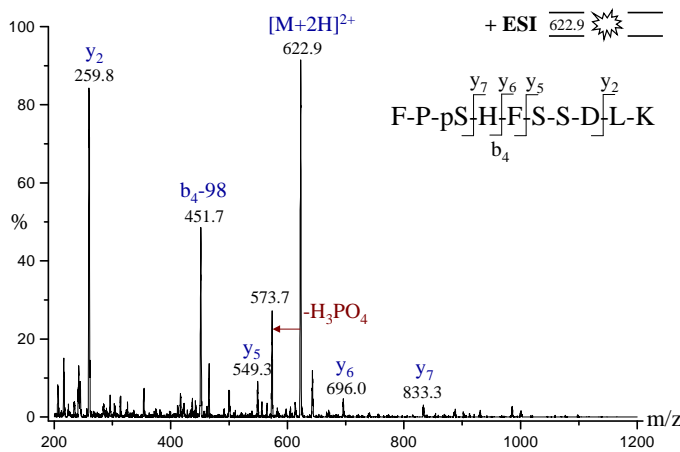


Abbildung 4.9: Fragmentationenspektrum eines Phosphopeptids, das im Trypsin-Verdau der fünffach phosphorylierten katalytischen α -Untereinheit der PKA detektiert wurde. Aus dem Spektrum lässt sich die Phosphorylierung an Ser259 als fünfte Phosphorylierungsstelle nachweisen.

Rekombinante C β -Untereinheit

Die C α -Untereinheit der PKA ist bei Säugetieren in den meisten Geweben das dominierende Isoenzym. Die C β -Untereinheit wird vor allem im Gehirn und in reproduktivem Gewebe exprimiert. Die beiden Isoformen zeigen starke Sequenzhomologie und tragen lediglich an 19 Positionen unterschiedliche Aminosäuren. Wie die C α -Untereinheit unterliegt auch die C β -Untereinheit bei der Expression in *e. coli* der katalytischen Autophosphorylierung. Die C β -Untereinheit wurde analog der Präparation der C α -Untereinheit mittels Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt (F. Gesellchen, Abteilung Pathochemie, DKFZ, Heidelberg), und die Phosphorylierungsstellen des Enzyms wurden durch eine massenspektrometrische Analyse bestimmt. Neben den zu C α analogen Phosphorylierungsstellen an Ser10, Ser139, Thr197 und Ser338 konnte noch eine weitere C β -spezifische Phosphorylierungsstelle an Ser321 nachgewiesen werden. Das entsprechende tryptische Phosphopeptid wurde im Neutralverlust-Scan bei m/z 1535.8 detektiert (Daten nicht gezeigt). Das Fragmentationenspektrum dieses zweifach phosphorylierten Peptids ist in Abbildung 4.10 dargestellt. Es zeigt neben dem sequentiellen Neutralverlust von zwei Molekülen Phosphorsäure praktisch keine weiteren sequenzspezifischen Fragmentationen. Dennoch ist die Identifizierung des tryptischen Peptids FRGSGDTSNFDDYEEEDIRVSITEK anhand seiner Molekülmasse eindeutig. Da es sich um eine Autophosphorylierung der PKA handelt, kommen nur die Positionen 321 und 338 für eine Phosphorylierung in Frage, da nur diese Positionen innerhalb einer PKA-Konsensus-Sequenz (K/R-X₁₋₂-S/T) (Kennelly & Krebs,

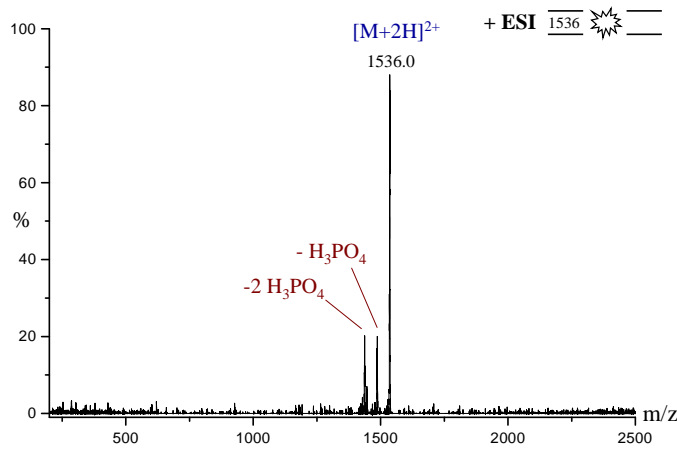


Abbildung 4.10: Fragmentationsspektrum eines zweifach phosphorylierten Peptids, das im Trypsin-Verdau der katalytischen β -Untereinheit der PKA detektiert wurde. Das Peptid zeigt den sequentiellen Neutralverlust von zwei Molekülen Phosphorsäure.

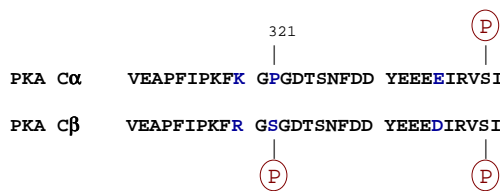


Abbildung 4.11: Ausschnitt eines Sequenzvergleichs zwischen der katalytischen α - und β -Untereinheit der PKA. Der gewählte Ausschnitt zeigt drei der insgesamt 19 Positionen, an denen sich die Sequenz der beiden Isoenzyme unterscheidet (blau markiert). Die Phosphorylierung an Ser321 ist spezifisch für die β -Untereinheit.

1991) liegen. Die Phosphorylierungsstelle an Ser321 ist spezifisch für C β , da C α an dieser Position ein Prolin trägt (siehe Abbildung 4.11).

4.3 Myristoylierung von GAPR-1

Golgi-associated Plant Pathogenesis-related Protein 1 (GAPR-1) gehört zur Proteinsuperfamilie der *Plant Pathogenesis-related Proteins* (PR-Proteine). PR-Proteine wurden erstmals in Pflanzen entdeckt, wo deren Expression durch eine Infektion mit Viren induziert wird. Später wurden auch in einer ganzen Reihe anderer Organismen, u.a. beim Menschen, Proteine mit einer ausgeprägten Sequenzhomologie zu den PR-Proteinen entdeckt. GAPR-1 ist auf der cytosolischen Seite der Golgi-Membran lokalisiert. Da das Protein an Position 1 ein Gly und an Position 5 ein Ser trägt (Konsensus-Sequenz für Myristoylierung), könnte eine N-terminale Modifizierung des Proteins durch Myristinsäure (siehe Kapitel 1.1) bei der Membranassoziation eine wichtige Rolle spielen. Um die Frage zu klären,

ob GAPR 1 *in vivo* myristoyliert wird, wurde das Protein aus Golgi-Membranen isoliert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (R.L. Serrano, Biochemie-Zentrum Heidelberg). Die Coomassie-gefärbte Gelbande wurde aus dem Gel ausgeschnitten, und das Protein wurde im Gel mit Trypsin gespalten. Nach der Extraktion der tryptischen Peptide aus dem Gel wurde die Peptidmischung mittels nanoESI-MS analysiert. Das entsprechende TOF-Massenspektrum ist in Abbildung 4.12 dargestellt. Bei einem m/z -Wert von 414.3 ließ sich ein Signal detektieren, das dem m/z -Wert des einfach protonierten tryptischen Peptids myrGK entspricht. Die Intensität dieses Peaks lag bei etwa 3 % der Intensität des Basispeaks. In Abbildung 4.13 a ist eine Ausschnittsvergrößerung des intern kalibrierten (*Lock-Masse* m/z 409.164) TOF-Spektrums mit den entsprechenden Präzisionsmassen dargestellt. Zum Vergleich zeigt Abbildung 4.13 b die aus der Summenformel von myrGK ($C_{22}H_{44}N_3O_4$) berechnete Isotopenverteilung. Der experimentelle m/z -Wert des detektierten Peptids weicht nur 2 mDa (4.8 ppm) von dem berechneten Wert ab, die Abweichung beim ersten Isotopenpeak beträgt nur 1 mDa. Das myristoylierte Peptid zeigt aufgrund seines hohen Wasserstoffgehalts (44 Wasserstoffatome) eine für ein Peptid ungewöhnlich hohe Präzisionsmasse. Dies wird in Abbildung 4.14 deutlich, in der die relative Häufigkeit von Peptidmassen gegen die monoisotopische Molekülmasse aufgetragen ist (Lehmann et al., 2000a). Die berechnete Molekülmasse für myrGK liegt 116 mDa höher als das Maximum dieser Häufigkeitsverteilung. Somit ist schon alleine die Präzisionsmasse des detektierten Signals ein starkes Indiz für das Vorhandensein des Peptids myrGK. Zur weiteren Verifizierung wurde ein Fragmentationenspektrum des Peptids bei m/z 414.3 aufgenommen, das in Abbildung 4.15 a dargestellt ist. Das Spektrum zeigt alle zu erwartenden sequenzspezifischen Ionen: y_1 , y_2 , a_1 , b_0 und b_1 . Trotz der schwachen Intensität einzelner Fragmentationen ist die Abweichung der Präzisionsmasse nach interner Kalibrierung (*Lock-Masse* y_2 bei m/z 204.135) bei keinem Ion größer als 4 mDa. In Abbildung 4.15 b ist das Fragmentationenspektrum des synthetischen Peptids myrGK zu sehen. Ein Vergleich der beiden Spektren lässt keinen Zweifel an der Identität des im Trypsin-Verdau detektierten Peptids zu, womit die Myristoylierung von GAPR-1 eindeutig nachgewiesen werden konnte.

4.4 „Top-Down“-Analyse: Dynamin A

Dynamin A aus *Dictyostelium discoideum* besteht aus 853 Aminosäuren und zeigt bis zu 44 % Sequenzidentität mit anderen Dynamin-artigen Proteinen anderer Spezies (Wienke et al., 1999). Die Dynamin-artigen Proteine zählen zur Protein-Superfamilie der GTP-bindenden Proteine und spielen bei einer ganzen Reihe von zellulären Prozesse, wie bei-

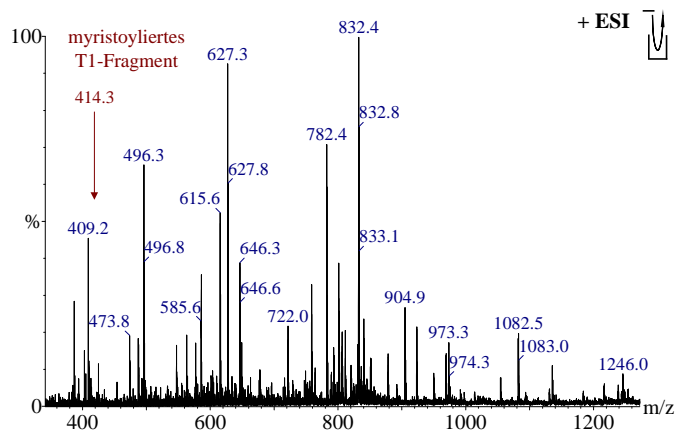


Abbildung 4.12: NanoESI-TOF-Massenspektrum des Trypsin-Verdaus von GAPR-1. Bei einem m/z -Wert von 414.3 lässt sich ein Signal detektieren, das dem m/z -Wert für das tryptische Peptid myrGK entspricht. Die Intensität dieses Peaks liegt bei etwa 3 % der Intensität des Basispeaks.

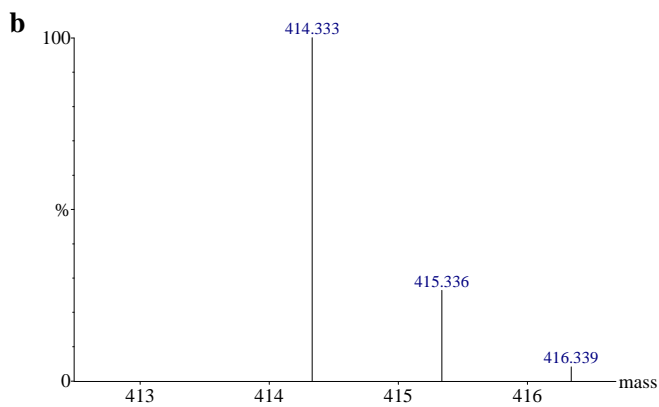
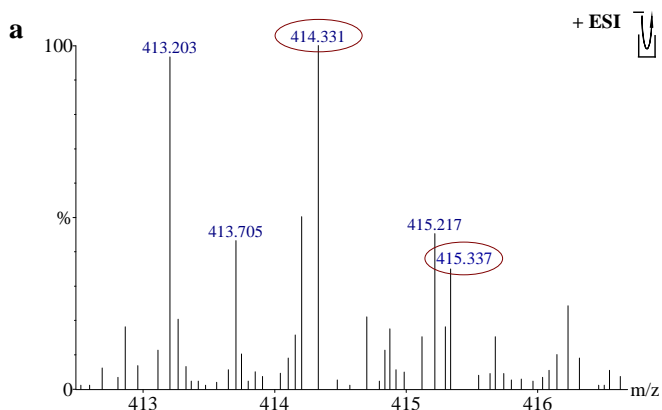


Abbildung 4.13: a) Ausschnittsvergrößerung des intern kalibrierten (*Lock-Masse* m/z 409.164) nano ESI-TOF-Spektrums des Trypsin-Verdaus von GAPR-1; b) berechnete Isotopenverteilung und Präzisionsmasse für das Peptid myrGK ($C_{22}H_{44}N_3O_4$). Der experimentelle m/z -Wert des detektierten Peptids weicht nur 2 mDa (4.8 ppm) von dem berechneten Wert ab, die Abweichung beim ersten Isotopenpeak beträgt nur 1 mDa.

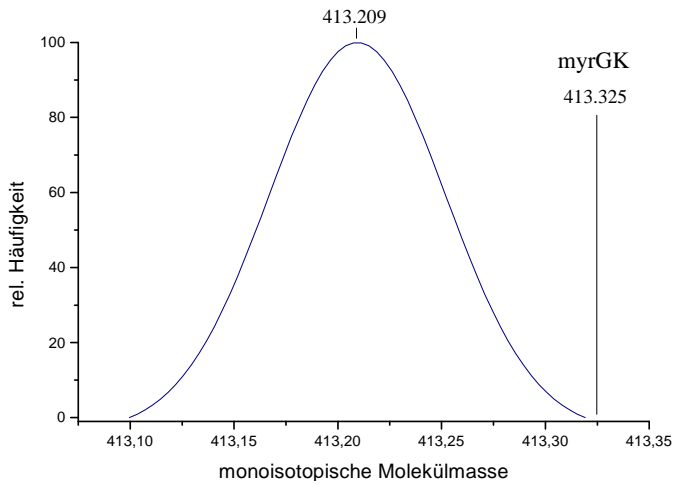


Abbildung 4.14: Berechnete Präzisionsmassenverteilung für unmodifizierte Peptide mit einer Molekülmasse von 413, die mit Hilfe des Internet-Tools Glypeps berechnet wurde (www.dkfz-heidelberg.de/spec/glypeps). Die Präzisionsmasse des modifizierten Peptids myrGK liegt aufgrund seines hohen Anteils an Wasserstoff weit oberhalb dieser Verteilung.

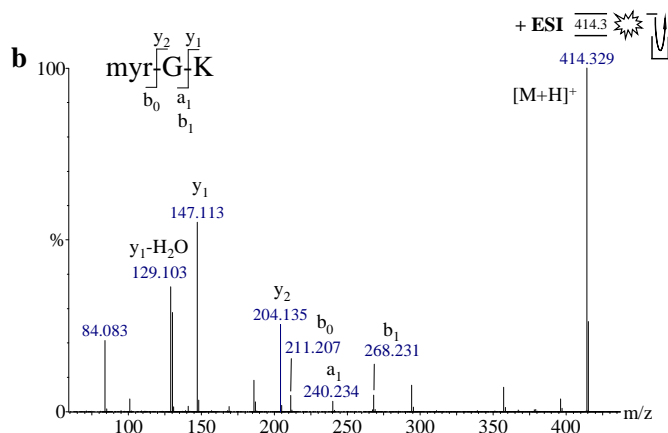
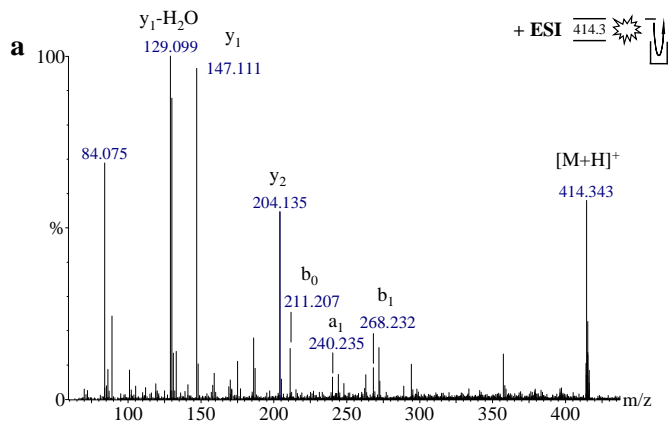


Abbildung 4.15: Fragmentationsspektren des modifizierten Peptids myrGK (intern kalibriert, *Lock-Masse* y_2 bei m/z 204.135). a) Fragmentationsspektrum des im Trypsin-Verdau von GAPR-1 detektierten Peptids bei m/z 414.3. b) Fragmentationsspektrum des synthetischen Peptids myrGK. In beiden Spektren finden sich alle zu erwartenden sequenzspezifischen Ionen.

spielsweise bei unterschiedlichen Formen der Endozytose, eine wichtige Rolle.

Das aus *D. discoideum* aufgereinigte Protein (B. Klockow, MPI für Medizinische Forschung, Heidelberg) wurde mittels nanoESI-MS auf das Vorhandensein kovalenter Modifikationen untersucht. Wie in Kapitel 4.1 erläutert, ist die sog. „Top-Down“-Analyse eine effektive Strategie zur Lokalisierung und Identifizierung kovalenter Modifikationen. Eine „Top-Down“-Analyse beginnt mit der experimentellen Bestimmung der Molekülmasse des intakten Proteins. Dies ist eine wichtige Information, denn aus dem Vergleich der experimentell bestimmten Molekülmasse mit der aus der Aminosäuresequenz des Proteins berechneten Molekülmasse lassen sich schon häufig wichtige Schlüsse auf das Vorhandensein bestimmter Modifikationen ziehen. Abbildung 4.16 zeigt das dekonvolutierte nanoESI-TOF-Spektrum von Dynamin A. Die experimentell bestimmte Molekülmasse des Proteins ist 42 Da größer als die aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekülmasse. Zur Lokalisierung und Identifizierung der Modifikation wurde das Protein zunächst mit BrCN gespalten. Die BrCN-Spaltung hat den Vorteil, dass sie in aller Regel große Fragmente generiert, die sich aufgrund der hohen Selektivität der Spaltung (ausschließlich nach Met) leicht identifizieren lassen. Damit lassen sich weite Teile des Proteins schnell als unmodifizierte Bereiche erkennen. Um andere Bereiche der Sequenz zu erfassen, wurde das Protein in einer alternativen Proteolyse partiell mit Chymotrypsin verdaut (24 h bei 0 °C). Schließlich wurde Dynamin A mit Trypsin gespalten, und die generierten Peptide wurden mittels nanoESI-MS/MS (unter Einsatz des automatischen *MS-to-MS/MS-switching*) analysiert. Die Sequenzabdeckung, die mit diesen drei alternativen Spaltungen erreicht wurde, ist in Abbildung 4.17 dargestellt. Die Sequenzabdeckung, die mit der BrCN-Spaltung und dem partiellen Chymotrypsin-Verdau erreicht wird, beträgt jeweils 46 %, mit dem Trypsin-Verdau wird eine Sequenzabdeckung von 66 % erreicht. Mit der Kombination aller drei Spaltungen erzielt man eine Sequenzabdeckung von 96 %.

Eine häufig auftretende kovalente Modifikation, welche mit der am intakten Protein beobachteten Massendifferenz von 42 Da kompatibel ist, ist die N-terminale Acetylierung. Da nach der oben beschriebenen Analyse 96 % des Proteins in unmodifizierter Form vorliegt und das unmodifizierte N-terminale Peptid in keinem der drei Proteaseansätze nachgewiesen werden konnte, ist eine Modifikation des N-Terminus durch einen Acetylrest sehr wahrscheinlich. Zum eindeutigen Nachweis der Acetylierung wurden alle automatisch generierten Fragmentionen-Spektren der tryptischen Peptide auf das Vorhandensein des zu erwartenden acetylierten a_1 - (m/z 146.06) und b_1 -Ions (m/z 174.06) hin untersucht. Zu diesem Zweck wurden die sog. selektiven Ionenchromatogramme der beiden Ionen erstellt. Bei der Erstellung eines Ionenchromatogramms wird ein Datenfile auf das Vorhandensein eines bestimmten Ions durchsucht. Im Ionenchromatogramm erscheint an der Stelle ein

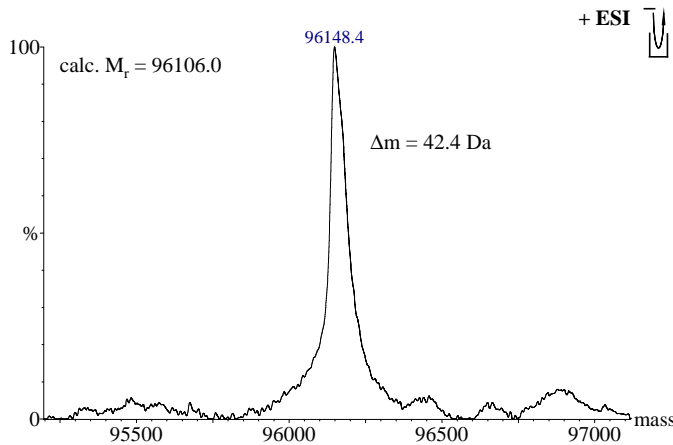


Abbildung 4.16: Dekontolviertes nanoESI-TOF-Massenspektrum von Dynamin A aus *D. discoideum*. Die experimentell bestimmte Molekülmasse ist 42 Da größer als die aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekülmasse.

Peak, an der der m/z -Wert des gesuchten Ions in den Massenspektren vorhanden ist. Wie in den selektiven Ionenchromatogrammen für $m/z 146.06 \pm 0.1$ und $m/z 174.06 \pm 0.1$ in Abbildung 4.18 zu sehen ist, lassen sich das a_1 - und das b_1 -Ion des acetylierten T1-Fragments in den gleichen Fragmentionen-Spektren detektieren. Die m/z -Werte der beiden Vorläufer-Ionen dieser MS/MS-Spektren entsprechen dem des zweifach protonierten, acetylierten T1-Fragments und dem des einfach protonierten Natrium-Addukts des acetylierten T1-Fragments. Um das acetylierte T1-Fragment in den Ionenchromatogrammen selektiv identifizieren zu können, müssen diese mit einer Massenpräzision von ± 0.1 Da erstellt werden. Schon die Suche mit einer Massenpräzision von ± 0.15 Da führt hier zu falsch positiven Signalen im Chromatogramm. Die eben beschriebene Strategie zur Identifizierung der N-terminalen Acetylierung ist auch auf andere N-terminale Modifikationen, wie beispielsweise Myristoylierung oder Formylierung, übertragbar. In Abbildung 4.19 ist das Fragmentionen-Spektrum des zweifach protonierten, acetylierten T1-Fragments dargestellt. Das Spektrum zeigt eine komplette y -Ionen-Serie von y_1 bis y_9 , wobei das y_5 -Ion erwartungsgemäß die größte Intensität (bevorzugte Fragmentierung auf der N-terminalen Seite von Prolin) aufweist. Anhand dieses MS/MS-Spektrums war die N-terminale Acetylierung von Dynamin A zweifelsfrei nachzuweisen.

Ac-MDQLIPVINK LQDVFNLTGS DPLDLPQIVV VGSQSSGKSS VLENIVGRDF
 LPRGSGIVTR RPLILQLTHL PIADDGSQTQ EWGEFLHKPN DMFYDFSEIR
 EEIIRDTRM TGKNKGISAQ PINLKIYSPH VVNLTLVDLP GITKVPVGDQ
 PTDIEQQIRR MVMAYIKKQN AIIIVAVTPAN TDLANSDALQ LAKEVDPEGK
 RTIGVITKLD LMDKGTDAME VLTGRVIPLT LGFIGVINRS QEDIIAKKSI
 RESLKSEILY FKNHPYKSI ANRSGTAYLS KTLNKLMLFH IRDTLPDLKV
 KVSKMLSDVQ GELSTYGDPL YDTKNSQCAL LLQIITIFSS NFKDAIDGKL
 TDLNNELYG GARISYIFNE IYSHCVNNID PLEGISLNDI RTTMRNATGP
 RAALFIPEIS FELLVKKQVV RLEEPSAQCQV EYVYDELQRI VSQLEAKELS
 RFINLKVARI EVVNNLLQKH KVPTKTMIEH LIKIETAFIN TSHPDFVGGG
 GIFESLYKKQ QLQQQNHQQ LQDQYQQQQQ QQQQQQQQNG INNNQKGDNG
 NMNVNQNMN QQNMNQNQNS TNPFLQQQQQ GQNKYPGGPP AQQQPNQQPN
 QLNKGPQNMV PNQSKPSSIP QNGPNNNNNN NNNNNRQDHQ QGSFFSSFFR
 ASPDPSLGQY GGANNSNNSN NPTSPINSSS NSGNNYNTFG GQQSSSSSSQ
 QLQSSSQSY KTSYNNNNNS SSNNSSYNRY QDDFYGRGDK LNQVPSIIKA
 PDDLTSKEKF ETELIRELLI SYFNIVKKNV KDSVPKSIKH FLVNQSKHEI
 QNELVAALYK EELFDELLEE SPQISSKRKS CKAMIEILRK ANEINEIRD
 FRN

■ = Trypsin, ■ = Chymotrypsin (partiell), ■ = BrCN

Abbildung 4.17: Aminosäuresequenz von Dynamin A aus *D. discoideum*. Die im Trypsin-Verdau, im partiellen Chymotrypsin-Verdau und in der BrCN-Spaltung nachgewiesenen Peptide sind farblich markiert. Die Sequenzabdeckung, die mit der BrCN-Spaltung und dem partiellen Chymotrypsin-Verdau erreicht wird, beträgt jeweils 46 %, mit dem Trypsin-Verdau wird eine Sequenzabdeckung von 66 % erreicht. Mit der Kombination aller drei Spaltungen wird eine Sequenzabdeckung von 96 % erzielt.

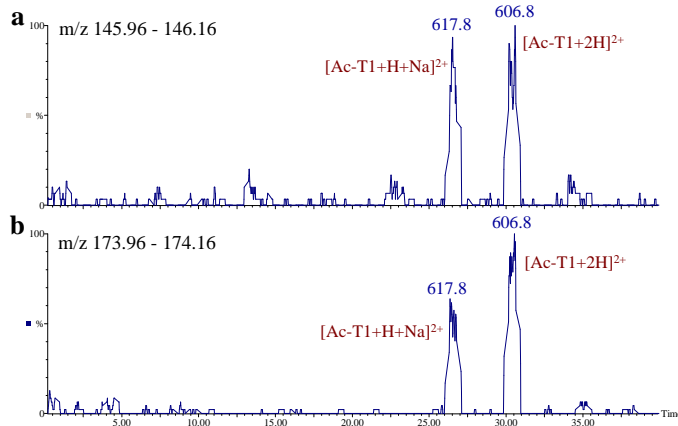


Abbildung 4.18: Ionenchromatogramme zur selektiven Detektion des acetylierten T1-Fragments, extrahiert aus einer automatischen nanoESI-MS/MS-Analyse eines tryptischen Verdau von Dynamin A. a) Selektives Ionenchromatogramm für das a₁-Ion des acetylierten T1-Fragments; b) selektives Ionenchromatogramm für das b₁-Ion des acetylierten T1-Fragments. Die m/z-Werte der beiden Vorläufer-Ionen (606.8 und 617.8) entsprechen dem des zweifach protonierten, acetylierten T1-Fragments und dem des einfach protonierten Natrium-Addukts des acetylierten T1-Fragments.

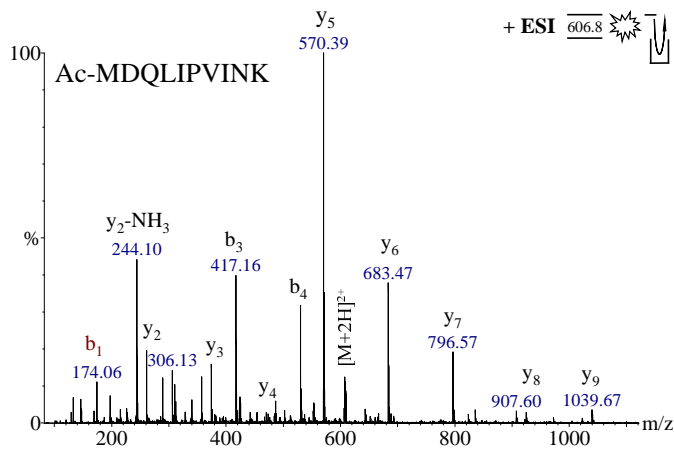


Abbildung 4.19: Fragmentationenspektrum des zweifach protonierten, acetylierten T1-Fragments von Dynamin A. Das Spektrum zeigt eine komplette y-Ionen-Serie von y_1 bis y_9 , wobei das y_5 -Ion erwartungsgemäß die größte Intensität besitzt (bevorzugte Fragmentierung auf der N-terminalen Seite von Prolin).

Kapitel 5

Analyse der Domänenstruktur von Proteinen

5.1 Einleitung

Funktionelle Domänen eines Proteins sind in aller Regel kompakt gefaltete Bereiche, die durch Linker-Regionen miteinander verbunden sind. Die Linker-Regionen bestehen meist aus sterisch weniger anspruchsvollen, hydrophilen Aminosäuren und haben eine wenig geordnete, flexible Struktur. Eine Endoprotease spaltet bei einem nativ gefalteten Protein zunächst bevorzugt in den Linker-Regionen, da hier die Schnittstellen für die Protease leichter zugänglich sind als in den kompakt gefalteten Domänen des Proteins. Dies bildet die Grundlage für die Charakterisierung der Domänenstruktur von Proteinen mittels partieller Proteolyse (Taniuchi & Anfinsen, 1969; Chait, 1994; Kriwacki & Siuzdak, 1998; Lanman et al., 1999). Für die Trennung und Identifizierung der Domänen können unterschiedliche Methoden (z.B. Gelfiltrations-Chromatographie oder SDS-PAGE zur Auftrennung und N-terminale Edman-Sequenzierung zur Identifizierung) eingesetzt werden. Im Folgenden soll am Beispiel von Dynamin A aus *D. discoideum* gezeigt werden, wie sich Proteindomänen unter Einsatz der Tandem-Massenspektrometrie effektiv identifizieren lassen.

5.2 Domänenstruktur von Dynamin A

Dynamin A wurde aus *D. discoideum* aufgereinigt und mit unterschiedlichen Endoproteasen (Papain, Subtilisin und Trypsin) einer partiellen Proteolyse unterzogen (B. Klockow, MPI für Medizinische Forschung, Heidelberg). Um die Spaltungen der Proteasen möglichst auf die Linker-Regionen zu beschränken, wurde Dynamin A in 10 000fachem

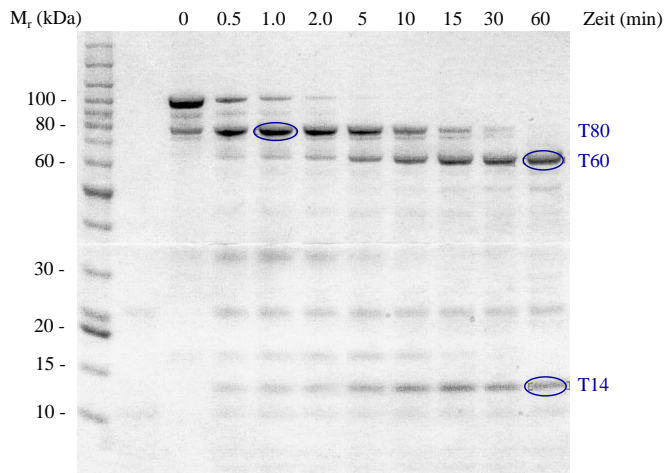


Abbildung 5.1: SDS-PAGE der durch partiellen Trypsin-Verdau von Dynamin A generierten Proteinfragmente. Das Protein wurde bei 0 °C für 0.5, 1.0, 2.0, 5, 10, 15, 30 und 60 min im Verhältnis 1:10 000 (w/w) mit Trypsin inkubiert. Das T80-, das T60- und das T14-Fragment wurden nach einem in-Gel-Trypsin-Verdau mittels nano ESI-MS/MS analysiert.

Überschuss (w/w) bei 0 °C mit den entsprechenden Endoproteasen inkubiert. Die Spaltungsreaktionen wurden nach unterschiedlichen Zeiten mit SDS-Probenpuffer abgestoppt, und die generierten Proteinfragmente wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. In Abbildung 5.1 ist exemplarisch das Ergebnis einer solchen Versuchsreihe für Trypsin gezeigt. Bei der partiellen Proteolyse von Dynamin A entstehen hier drei stabile Proteinfragmente mit einer Größe von etwa 80 kDa, 60 kDa und 14 kDa. Die entsprechenden Coomassie-gefärbten Gelbanden wurden ausgeschnitten, und die Proteinfragmente wurden im Gel mit Trypsin gespalten. Anschließend wurden von den aus dem Gel extrahierten tryptischen Peptiden unter Einsatz des automatischen *MS-to-MS/MS-Switching* Fragmentationen-Spektren generiert. Die Option des Suchprogramms Mascot (Perkins et al., 1999), eine Suche in einer Proteindatenbank mit uninterpretierten Fragmentationen-Spektren durchzuführen, wurde für die Interpretation der Tandem-MS-Daten genutzt. Das Ergebnis einer solchen Datenbanksuche ist am Beispiel des T14-Fragments, welches beim partiellen Trypsin-Verdau von Dynamin A gebildet wird, in Abbildung 5.2 gezeigt. Es wurden ausschließlich Peptide aus der C-terminalen Region von Dynamin A identifiziert. Das auf diese Weise identifizierte Proteinfragment hat eine Molekülmasse von 14561.7 Da, was gut mit der im SDS-Gel bestimmten Molekülmasse von 14 kD übereinstimmt.

In gleicher Weise wurden auch das T60- und das T80-Fragment aus dem partiellen Trypsin-Verdau und die Proteinfragmente, die mit Papain (P14, P20, P39 und P58) und Subtilisin (S14 und S58) gebildet wurden, analysiert. Die Ergebnisse aller partiellen Spaltungen sind in Abbildung 5.3 a zusammengefasst. Die schraffierten Flächen repräsentieren Bereiche, die anhand von Tandem-MS-Daten identifiziert wurden. Da beim Trypsin-Verdau der Proteindomänen in der Regel keine vollständige Sequenzabdeckung erreicht wird, lassen sich die N- bzw. C-terminalen Grenzen der Domänen nicht immer auf die Aminosäure genau festlegen. Die Größe der Domänen lässt sich aber durch die im SDS-

```

Ac-MDQLIPVINK LQDVFNLTGSL DPLDLPQIVV VGSQSSGKSS VLENIVGRDF
LPRGSGIVTR RPLILQLTHL PIADDSQTQ EWGEFLHKPN DMFYDFSEIR
EEIIRDTRM TGKNKGISAQ PINLKIYSPH VVNLTLVDLP GITKVPVGDQ
PTDIEQQIRR MVMAYIKKQN AIIIVAVTPAN TDLANSDALQ LAKEVDPEGK
RTIGVITKLD LMDKGTDAME VLTGRVIPLT LGFIGVINRS QEDIIAKCSI
RESLKSEILY FKNHPIYKSI ANRSGTAYLS KTLNKLLMFH IRDTLPDLKV
KVKMMLSDVQ GELSTYGDPL YDTKNSQGAL LLQIITIFSS NFKDAIDGKL
TDLNNELYG GARISYIFNE IYSHCVNNID PLEGISLNDI RTTMRNATGP
RAALFIPEIS FELLVKKQV V RLEEPSAQC V EYVYDELQRI VSQLEAKELS
RFINLKARVI EVVNNLLQKH KVPTKTMIEH LIKIETAFIN TSHPDFVGGE
GIFESLYKKQ QLQQQNHLQQ LQDQYQQQQQ QQQQQQQQNG INNNQKGDNG
NMNVNQQNMN QQNMNQQNQS TNPFLQQQQQ GQNKYPGGPP AQQQPNQQPN
QLNKGPQNP PNQSKPSSIP QNGPNNNNNN NNNNNRQDHQ QGSFFSSFFR
ASPDPSLGQY GGANNSNNSN NPTSPINSSS NSGNNYNTFG GQQSSSSSSQ
QLQSSSQSY KTSYNNNNNS SSNNSYNRY QDDFYGRGDK LNQVPSIIKA
PDDLTSKEKF ETELIRELLI SYFNIVKKNV KDSVPSIMH FLVNQSKEHI
QNELVAALYK EELFDELLEE SPQISSKRKS CKAMIEILRK ANEINEIRD
FRN

```

Abbildung 5.2: Aminosäuresequenz von Dynamin A aus *D. discoideum*. Die blau markierten Sequenzen wurden nach einem tryptischen in-Gel-Verdau mit den automatisch generierten Fragmentionen-Spektren durch eine Datenbanksuche mit dem Suchprogramm Mascot identifiziert. Das C-terminale Proteinfragment hat eine Molekülmasse von 14561.7 Da.

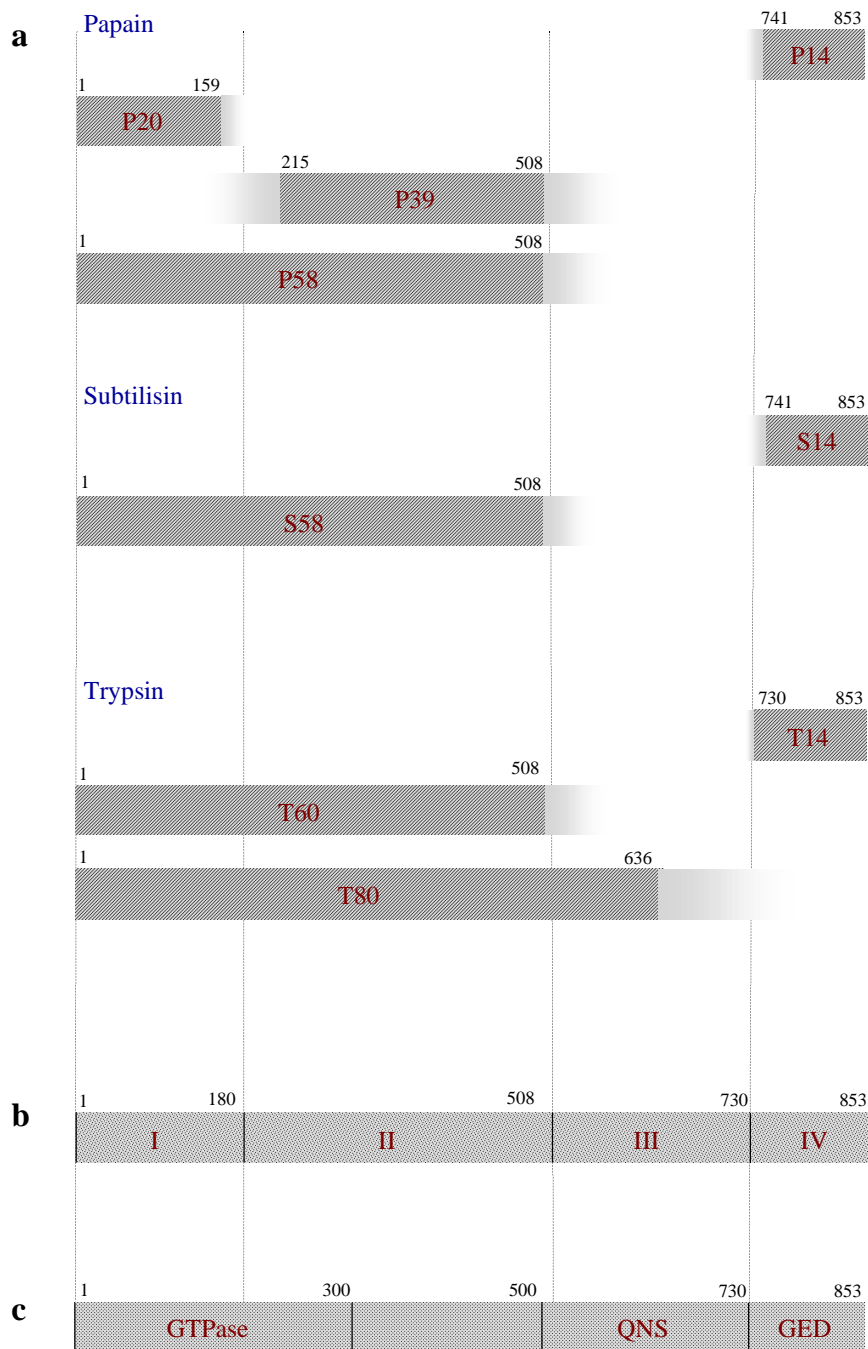


Abbildung 5.3: Domänenstruktur von Dynamin A aus *D. discoideum*. a) Proteinfragmente, die bei der partiellen Proteolyse von Dynamin A mit Papain, Subtilisin und Trypsin gebildet werden. Die schraffierten Flächen repräsentieren mittels Tandem-MS identifizierte Peptide; b) postulierte Domänenstruktur von Dynamin A, die sich aus den Ergebnissen der partiellen Proteolyse-Experimente ableiten lässt; c) postulierte Domänenstruktur von Dynamin A, die sich aus Sequenzvergleichen mit anderen Dynamin-artigen Proteinen und aus Sekundärstrukturvorhersagen ableiten lässt (nach Wienke et al., 1999); QNS, Glutamin-Asparagin-Serin-reiche Domäne; GED, GTPase-Effektor-Domäne.

Gel ermittelte Molekülmassen eingrenzen, wobei der Fehler dieser Molekülmassen hier mit $\pm 10\%$ angenommen wurde. Abbildung 5.3 b zeigt die Domänenstruktur von Dynamin A, wie sie sich aufgrund der Ergebnisse aus den partiellen Proteolyse-Experimenten postulieren lässt. Demnach lassen sich vier Domänen vorhersagen: Domäne I von Position 1 - 180, Domäne II von Position 180 - 508, Domäne III von Position 508 - 730, und Domäne IV von Position 730 - 853. In Abbildung 5.3 c ist zum Vergleich die postulierte Domänenstruktur von Dynamin A dargestellt, die sich aus Sequenzvergleichen mit anderen Dynamin-artigen Proteinen und aus Sekundärstrukturvorhersagen ableiten lässt (Wienke et al., 1999). Die beiden postulierten Domänenstrukturen (Abbildung 4.22 b und c) zeigen in der C-terminalen Region sehr gute Übereinstimmung. Die postulierte Domäne IV stimmt auf die Aminosäure genau mit der sog. GTPase-Effektor-Domäne (GED) überein, die sich durch Sequenzvergleich mit anderen Dynamin-artigen Proteinen vorhersagen lässt. Im Falle von humanem Dynamin 1 konnte gezeigt werden, dass diese Domäne für eine effektive GTPase-Aktivität notwendig ist (Muhlberg et al., 1997). Domäne III zeigt sehr gute Übereinstimmung mit der sog. Glutamin-Asparagin-Serin-reichen Domäne (QNS). Diese Region zeigt keine Sequenzähnlichkeiten zu anderen Dynamin-artigen Proteinen. Aufgrund der vielen polaren Aminosäuren ist diese Region sehr hydrophil und befindet sich wahrscheinlich an der Oberfläche des Proteins. Nicht ganz so eindeutig ist das Bild bei den Domänen I und II. Nimmt man diese beiden Domänen zusammen, dann erhält man ein etwa 58 kDa großes Fragment. Ein N-terminales Fragment dieser Größe wird auch bei der partiellen Proteolyse von humanem Dynamin 1 beobachtet (Muhlberg & Schmid, 2000), das in diesem Bereich große Sequenzähnlichkeiten mit Dynamin A besitzt. Bei der partiellen Proteolyse von Dynamin A mit Papain kommt es etwa an Position 180 zu einer Spaltung, die innerhalb der GTPase-Domäne (Position 1 - 300) liegt. Die Kristallstruktur der GTPase-Domäne zeigt, dass sich in diesem Bereich ein Loop aus neun Aminosäuren befindet (Niemann et al., 2001). Dieser Loop enthält eine Papain-Spaltstelle und ist für diese Protease offenbar gut zugänglich.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Die Kombination aus proteolytischer Spaltung, massenspektrometrischer Analyse und Datenbanksuche ist eine etablierte Methode zur Identifizierung von Proteinen. Die Identifizierung eines Proteins in einer Sequenzdatenbank ist beim Einsatz von Sequenzinformation in der Regel anhand eines einzelnen Peptids möglich. Ist die Identität eines Proteins geklärt, dann stellt sich im Anschluß daran häufig die Frage nach den posttranslationalen Modifikationen des Proteins. Auch hierfür ist die Massenspektrometrie eine prädestinierte und häufig angewandte Methode.

Eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen eukaryotischer Proteine ist die Phosphorylierung an Ser-, Thr- und Tyr-Resten, zu deren massenspektrometrischer Analyse eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden entwickelt wurden. In der vorliegenden Arbeit ist die Weiterentwicklung zweier massenspektrometrischer Methoden zur Analyse der Proteinphosphorylierung beschrieben: i) die Anwendung des Neutralverlust-Scans zur selektiven Detektion von Ser/Thr-phosphorylierten Peptiden in komplexen Peptidgemischen, und ii) die Anwendung der Metallaffinitätschromatographie zur selektiven Anreicherung von Phosphopeptiden aus komplexen Peptidgemischen.

Bei der Optimierung der Analytik der Proteinphosphorylierung mittels Neutralverlust-Scan hatte sich am Beispiel der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A gezeigt, dass die Verwendung einer Protease mit geringer Spaltungsspezifität (Elastase) wesentliche Vorteile gegenüber einer Protease mit hoher Spaltungsspezifität (Trypsin) besitzt. Die kleineren Elastase-generierten Phosphopeptide zeigen im Vergleich zu den Trypsin-generierten Phosphopeptiden eine effektivere Phosphorsäure-Abspaltung und lassen sich im Neutralverlust-Scan mit deutlich besserer Empfindlichkeit detektieren. Ein weiteres Vorteil der Elastase ist in ihrer Eigenschaft partiell überlappende Peptide zu generieren begründet, wodurch sich eine einzelne Phosphorylierungsstelle in der Regel in mehreren Phosphopeptiden wiederfindet. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit für eine vollständige

Erfassung aller Phosphorylierungsstellen eines Proteins.

Metallaffinitätschromatographie wurde eingesetzt, um die Elastase-generierten Phosphopeptide selektiv anzureichern. Es konnte gezeigt werden, dass die Metallaffinitätschromatographie eine geeignete Methode ist, um die Komplexität des Elastase-generierten Peptidgemischs drastisch zu reduzieren, so dass eine automatische Fragmentationen-Analyse aller angereicherten Peptide mittels nanoESI möglich ist. Die Anwendbarkeit und Leistungsfähigkeit der Kombination aus Elastase-Verdau, Metallaffinitätschromatographie und Q-TOF-Tandem-MS wurde am Beispiel des Transkriptionsinitiationsfaktors IA unter Beweis gestellt, wo mit Hilfe dieser Analysen-Strategie drei bislang unbekannte *in-vivo*-Phosphorylierungsstellen nachgewiesen werden konnten.

Die Metallaffinitätschromatographie hat den Vorteil, dass sie auf Ser-, Thr- und Tyrosphosphorylierte Peptide anwendbar ist, während die selektive Detektion von Phosphopeptiden mittels Neutralverlust-Scan auf Ser/Thr-phosphorylierte Peptide beschränkt ist. Ein Vorteil der selektiven Detektion von Phosphopeptiden mittels Neutralverlust-Scan ist, dass bei dieser Strategie kein zusätzlicher chromatographischer Schritt, der immer mit Probenverlust verbunden ist, erforderlich ist.

Neben der Proteinphosphorylierung wurden in dieser Arbeit auch eine Reihe anderer kovalenter Modifikationen untersucht. Bei der Analyse der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A konnten neben einer bislang unbekannten fünften Phosphorylierungsstelle an Ser259 auch die Modifikation von Cys343 durch Glutathion und die N-terminale Modifikation durch Gluconsäure nachgewiesen werden. Mittels Q-TOF-Tandem-MS wurde die *in-vivo*-Myristoylierung des humanen Proteins GAPR-1 nachgewiesen.

Die sog. „Top-Down“-Analyse basiert auf einer Strategie zur vollständigen Charakterisierung der kovalenten Modifikationen eines Proteins. Sie beginnt mit der Bestimmung der Molekülmasse des intakten Proteins. Im zweiten Schritt werden große Proteinfragmente generiert und analysiert, und im letzten Analysenschritt werden kleine Proteinfragmente mittels Tandem-MS analysiert. Am Beispiel des Proteins Dynamin A wurde gezeigt wie die Anwendung dieser Strategie zu einer vollständigen Charakterisierung aller kovalenten Modifikationen eines Proteins eingesetzt werden kann. Im Falle von Dynamin A konnte die Acetylierung des N-terminalen Methionins nachgewiesen werden. Andere kovalente Modifikationen konnten ausgeschlossen werden.

Im letzten Kapitel der vorliegenden Arbeit wird am Beispiel von Dynamin A gezeigt, wie sich die Kombination aus partieller proteolytischer Spaltung, Tandem-MS und Datenbanksuche effektiv zur Charakterisierung der Domänenstruktur von Proteinen einsetzen lässt.

Literaturverzeichnis

- Adams et al. (2000) The Genome Sequence of *Drosophila Melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195.
- Aderem, A. (1992) The MARCKS Brothers: a Family of Protein Kinase C Substrates. *Cell* **71**, 713-716.
- Amankwa, L.N., Harder, K., Jirik, F., Aebersold, R. (1995) High-Sensitivity Determination of Tyrosine-Phosphorylated Peptides by On-line Enzyme Reactor and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Protein Sci.* **4**, 113-125.
- Anderson, L., Porath, J. (1986) Isolation of Phosphoproteins by Immobilized Metal (Fe^{3+}) Affinity Chromatography. *Anal. Biochem.* **154**, 250-254.
- Annan, R.S., Carr, S.A. (1996) Phosphopeptide Analysis by Matrix-assisted Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **68**, 3413-3421.
- Arnott, D., Kottmeier, D., Yates, N., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. (1994) Fragmentation of Multiply Protonated Peptides Under Low Energy CID Conditions. *4th Proc. ASMS Conf. Mass Spectrom. Allied Top.*, Chicago, IL, USA; 470.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A. (1990) Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite: Implications for Endothelial Injury from Nitric Oxide and Superoxide. *Proc. Acad. Sci. USA* **87**, 1620-1624.
- Benore-Parsons, M., Seidah, N.G., Wennogle, L.P. (1989) Substrate Phosphorylation Can Inhibit Proteolysis by Trypsin-like Enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **272**, 274-280.
- Beuvink, I., Hess, D., Flotow, H., Hofsteenge, J., Groner, B., Hynes, N.E. (2000) Stat5a Serine Phosphorylation. Serine 779 is Constitutively Phosphorylated in the Mammary Gland, and Serine 725 Phosphorylation Influences Prolactin-Stimulated *in vitro* DNA Binding Activity. *J. Biol. Chem.* **275**, 10247-10255.
- Biemann, K. (1988) Contributions of Mass Spectrometry to Peptide and Protein Structure. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **16**, 99-111.
- Bieth, J.G. (1986) Elastase: Catalytic and Biological Properties. In *Biology of Extracellular Matrix, Vol. 1: Regulation of Matrix Accumulation*; Mecham, R.P. (Ed.). Academic Press, New York, S. 217-320.

- Bodem, J., Dobрева, G., Hoffmann-Rohrer, U., Iben, S., Zentgraf, H., Delius, H., Vingron, M., Grummt, I. (2000) TIF-IA, the Factor Mediating Growth-dependent Control of Ribosomal RNA Synthesis, is the Mammalian Homolog of Yeast Rrn3p. *EMBO Rep.* **1**, 171-175.
- Bradford, M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brahms, H., Raymackers, J., Union, A., de Keyser, F., Mehaus, L., Lührmann, R. (2000) The C-terminal RG Dipeptide Repeats of the Spliceosomal Sm Proteins D1 and D3 Contain Symmetrical Dimethylarginines, Which Form a Major B-cell Epitope for Anti-Sm Autoantibodies. *J. Biol. Chem.* **275**, 17122-17129.
- Cao, P., Stults, J.T. (1999) Phosphopeptide Analysis by On-line Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography-Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **853**, 225-235.
- Cao, P., Stults, J.T. (2000) Mapping the Phosphorylation Sites of Proteins Using On-line Immobilized Metal Affinity Chromatography/Capillary Electrophoresis/Electrospray Ionization Multiple Stage Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 1600-1606.
- Carr, S.A., Biemann, K., Shoji, S., Parmelee, D.C., Titani, K. (1982) n-Tetradecanoyl is the NH₂-terminal Blocking Group of the Catalytic Subunit of Cyclic AMP-dependent Protein Kinase from Bovine Cardiac Muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6128-6131.
- Carr, S.A., Huddleston, M.J., Bean, M.F. (1993) Selective Identification and Differentiation of N- and O-linked Oligosaccharides in Glycoproteins by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Protein Sci.* **2**, 183-196.
- Carr, S.A., Huddleston, M.J., Annan, R.S. (1996) Selective Detection and Sequencing of Phosphopeptides at the Femtomole Level by Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* **239**, 180-192.
- Cavallius, J., Zoll, W., Chakraborty, K., Merrick, W.C. (1993) Characterization of Yeast EF-1 α : Non-conservation of Post-translational Modifications. *Biochim. Biophys. Acta* **1163**, 75-80.

- Chait, B.T. (1994) Mass Spectrometry - A Useful Tool for the Protein X-Ray Crystallographer and NMR Spectroscopist. *Structure* **2**, 465-467.
- Chernushevich, I.V., Ens, W., Standing, K.G. (1999) Orthogonal-Injection TOF-MS for Analyzing Biomolecules. *Anal. Chem.* 452 A-461 A.
- Chowdhury, S.K., Katta, V., Beavis, R.C., Chait, B.T. (1990) Origin and Removal of Adducts (Molecular Mass = 98 u) Attached to Peptide and Protein Ions in Electrospray Ionization Mass Spectra. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1**, 382-388.
- Ciobra, M.A., Heinemann, S.H., Weissbach, H., Brot, N., Hoshi, T. (1997) Modulation of Potassium Channel Funktion by Methionine Oxidation and Reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9932-9937.
- Cohen, S.L., Chait, B.T. (1997) Mass Spectrometry of Whole Proteins Eluted from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis Gels. *Anal. Biochem.* **247**, 257-267.
- Comisarow, M.B., Marshall, A.G. (1974) Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **25**, 282-283.
- Covey, T., Shushan, B., Bonner, R. (1991) LC/MS and LC/MS/MS Screening for the Sites of Post-Translational Modification in Proteins. In *Methods in Protein Sequence Analysis*; Jörnvall, H., Höög, J.O., Gustavson, A.M. (Eds.). Birkhauser Verlag, Basel, S. 249-256.
- Cozzone, A.J. (1993) ATP-Dependent Protein Kinases in Bacteria. *J. Cell. Biochem.* **51**, 7-13.
- de Hoffmann, E. (1996) Tandem Mass Spectrometry: A Primer. *J. Mass Spectrom.* **31**, 129-137.
- Ding, J., Burkhart, W., Kassel, D.B. (1994) Identification of Phosphorylated Peptides from Complex Mixtures Using Negative-ion Orifice-potential Stepping and Capillary Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8**, 94-98.
- Dole, M., Mack, L.L., Hines, R.L., Mobley, R.C., Ferguson, L.D., Alice, M.B. (1968) Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* **49**, 2240-2249.
- Ehring, H., Stromberg, S., Tjernberg, A., Noren, B. (1997) Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Proteins Extracted Directly from Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gels. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, 1867-1873.

- Eng, J., McCormack, A., Yates III, J. (1994) An Approach to Correlate Tandem Mass Spectral Data of Peptides with Amino Acid Sequences in a Protein Database. *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **5**, 976-989.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M. (1989) Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* **246**, 64-71.
- Ficarro, S.B., McClelland, M.L., Strukenberg, P.T., Burke, D.J., Ross, M.M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., White, F.M. (2002) Phosphoproteome Analysis by Mass Spectrometry and its Application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Biotechnol.* **20**, 301-305.
- Fields, G.B., Noble, R.L. (1990) Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids. *Int. J. Peptide Protein Res.* **35**, 161-214.
- Fissolo, S., Bongiovanni, G., Decca, M.B., Hallak, M.E. (2000) Post-translational Arginylation of Proteins in Cultured Cells. *Neurochem. Res.* **25**, 71-76.
- Flora, J.W., Muddiman, D.C. (2001) Selective, Sensitive, and Rapid Phosphopeptide Identification in Enzymatic Digests Using ESI-FTICR-MS with Infrared Multiphoton Dissociation. *Anal. Chem.* **73**, 3305-3311.
- Forbes, A.J., Mazur, M.T., Patel, H.M., Walsh, C.T., Kelleher, N.L. (2001) Toward Efficient Analysis of > 70kDa Proteins with 100% Sequence Coverage. *Proteomics* **1**, 927-933.
- Ge, Y., Lawhorn, B.G., ElNaggar, M., Strauss, E., Park, J.H., Begley, T.P., McLafferty, F.W. (2002) Top Down Characterization of Larger Proteins (45 kDa) by Electron Capture Dissociation Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 672-676.
- Geiger, T., Clarke, S. (1987) Deamidation, Isomerization, and Racemization at Asparaginyl and Aspartyl Residues in Peptides. *J. Biol. Chem.* **262**, 785-794.
- Geoghegan, K.F., Dixon, H.B.F., Rosner, P.J., Hoth, L.R., Lanzetti, A.J., Borzilleri, K.A., Marr, E.S., Pezzullo, L.H., Martin, L.B., LeMotte, P.K., McColl, A.S., Kamath, A.V., Stroh, J.G. (1999) Spontaneous α -N-6-Phosphogluconoylation of a „His tag“ in *Escherichia coli*: The Cause of Extra Mass of 258 or 178 Da in Fusion Proteins. *Anal. Biochem.* **267**, 169-184.
- Glückmann, M., Karas, M. (1999) The Initial Ion Velocity and its Dependence on Matrix, Analyte, and Preparation Method in Ultraviolet Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization. *J. Mass Spectrom.* **34**, 467-477.

- Hakansson, K., Cooper, H.J., Emmett, M.R., Costello, C.E., Marshall, A.G., Nilsson, C.L. (2001) Electron Capture Dissociation and Infrared Multiphoton Dissociation MS/MS of an *N*-Glycosylated Tryptic Peptide to Yield Complementary Sequence Information. *Anal. Chem.* **73**, 4530-4536.
- Hanks, S.K., Hunter, T. (1995) The Eukaryotic Protein Kinase Superfamily: Kinase (Catalytic) Domain Structure and Classification. *FASEB J.* **9**, 576-596.
- Harbour, J.W., Luo, R.X., Santi, A.D., Postigo, A.A., Dean, D.C. (1999) Cdk Phosphorylation Triggers Sequential Intramolecular Interactions that Progressively Block Rb Funktionen as Cells Move through G1. *Cell* **98**, 859-869.
- Haystead, T.A.J., Garrison, J.C. (1999) Study of Protein Phosphorylation in Intact Cells. In *Protein Phosphorylation: a Practical Approach*, edn 2.; Hardie, D.G. (Ed.). Oxford University Press, Oxford, 1-31.
- He, F., Hendrickson, C.L., Marshall, A.G. (2001) Baseline Mass Resolution of Peptide Isobars: a Record for Molecular Mass Resolution. *Anal. Chem.* **73**, 647-650.
- Herberg, F.W., Bell, S.M., Taylor, S.S. (1993) Expression of the Catalytic Subunit of cAMP-dependent Protein Kinase in *Escherichia coli*: Multiple Isoenzymes Reflect Different Phosphorylation States. *Protein Eng.* **6**, 7712-777.
- Hershko, A., Ciechanover, A., Varshavsky, A. (2000) The Ubiquitin System. *Nat. Med.* **6**, 1073-1081.
- Hirata, R., Ohsumi, Y., Nakano, A., Kawasaki, H., Suzuki, K., Anraku, Y. (1990) Molecular Structure of a Gene, VMA1, Encoding the Catalytic Subunit of H⁺-Translocating Adenosine Triphosphatase from Vacuolar Membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **265**, 6726-6733.
- Horn, D.M., Ge, Y., McLafferty, F.W. (2000) Activated Ion Electron Capture Dissociation for Mass Spectral Sequencing of Larger (42 kDa) Proteins. *Anal. Chem.* **72**, 4778-4784.
- Hubbard, M.J., Cohen, P. (1993) On Target with a New Mechanism for the Regulation of Protein Phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 172-177.
- Huddleston, M.J., Annan, R.S., Bean, M.F., Carr, S.A. (1993) Selective Detection of Phosphopeptides in Complex Mixtures by Electrospray Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **4**, 710-717.

- Hunter, T. (1995) Protein Kinases and Phosphatases: The Yin and Yang of Protein Phosphorylation. *Cell* **80**, 225-236.
- Hunter, T. (2000) Signaling - 2000 and Beyond. *Cell* **100**, 113-127.
- Hunter, A.P., Games, D.E. (1994) Chromatographic and Mass Spectrometric Methods for the Identification of Phosphorylation Sites in Phosphoproteins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8**, 559-570.
- Huttner, W.B. (1987) Protein Tyrosine Sulfation. *Trends Biochem. Sci.* **12**, 361-363.
- Iribane, J.V., Thomson, B.A. (1976) On the Evaporation of Small Ions from Charged Droplets. *J. Chem. Phys.* **64**, 2287-2294.
- James, P., Quadroni, M., Carafoli, E., Gonnet, G. (1993) Protein Identification by Mass Profile Fingerprinting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 58-64.
- Jedrzejewski, P.T., Girod, A., Tholey, A., König, N., Thullner, S., Kinzel, V., Bossemeyer, D. (1998) A Conserved Deamidation Site at Asn2 in the Catalytic Subunit of Mammalian cAMP-dependent Protein Kinase Detected by Capillary LC-MS and Tandem Mass Spectrometry. *Protein Sci.* **7**, 457-469.
- Jedrzejewski, P.T., Lehmann, W.D. (1997) Detection of Modified Peptides in Enzymatic Digests by Capillary Liquid Chromatography/Electrospray Mass Spectrometry and a Programmable Skimmer CID Acquisition Routine. *Anal. Chem.* **69**, 294-301.
- Jiao, K., Mandapati, S., Skipper, P.L., Tannenbaum, S.R., Wishnok, J.S. (2001) Site-Selective Nitration of Tyrosine in Human Serum Albumine by Peroxynitrite. *Anal. Biochem.* **293**, 43-52.
- Jonsson, A.P., Aissouni, Y., Palmberg, C., Percipalle, P., Nordling, E., Daneholt, B., Jörnvall, H., Berman, T. (2001) Recovery of Gel-Separated Proteins for In-Solution Digestion and Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **73**, 5370-5377.
- Juhasz, P., Martin, S.A. (1997) The Utility of Nonspecific Proteases in the Characterization of Glycoproteins by High-Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **169/170**, 217-230.
- Kalo, M.S., Pasquale, E.B. (1999) Multiple *in vivo* Tyrosine Phosphorylation Sites in EphB Receptors. *Biochemistry* **38**, 14396-14408.

- Kane, P.M., Yamashiro, C.T., Wolczyk, D.F., Neff, N., Goebel, M., Stevens, T.H. (1990) Protein Splicing Converts the Yeast TFP1 Gene Product to the 69-kD Subunit of the Vacuolar H⁺-Adenosine Triphosphatase. *Science* **250**, 651-657.
- Karas, M., Glückmann, M., Schäfer, J. (2000) Ionization in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization: Singly Charged Molecular Ions are the Lucky Survivors. *J. Mass Spectrom.* **35**, 1-12.
- Karas, M., Hillenkamp, F. (1988) Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10,000 Daltons. *Anal. Chem.* **60**, 2299-2301.
- Kelleher, N.L., Lin, H.Y., Valaskovic, G.A., Aeserund, D.J., Fridriksson, E.K., McLafferty, F.W. (1997) Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 806-812.
- Kelleher, N.L., Zubarev, R.A., Bush, K., Furie, B., Furie, B.C., McLafferty, F.W., Walsh, C.T. (1999) Localization of Labile Posttranslational Modifications by Electron Capture Dissociation: The Case of γ -Carboxyglutamic Acid. *Anal. Chem.* **71**, 4250-4253.
- Kelleher, N.L. (2000) From Primary Structure to Function: Biological Insights from Large-Molecule Mass Spectrometry. *Chemistry & Biology* **7**, R37-R45.
- Kennelly, P.J., Krebs, E.G. (1991) Consensus Sequences as Substrate Specificity Determinants for Protein Kinases and Protein Phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266**, 15555-15558.
- Kinumi, T., Niwa, H., Matsumoto, H. (2000) Phosphopeptide Sequencing by In-Source Decay Spectrum in Delayed Extraction Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* **277**, 177-186.
- Kinzel, V., Hotz, A., König, N., Gagelmann, M., Pyerin, W., Reed, J., Kübler, D., Hofmann, F., Obst, C., Gensheimer, H.P., Goldblatt, D., Shaltiel, S. (1987) Chromatographic Separation of Two Heterogeneous Forms of the Catalytic Subunit of Cyclic AMP-dependent Protein Kinase Holoenzyme Type I and Type II from Striated Muscle of Different Mammalian Species. *Arch. Biochem. Biophys.* **253**, 341-349.
- Kinzel, V., König, N., Pipkorn, R., Bossemeyer, D., Lehmann, W.D. (2000) The Amino Terminus of PKA Catalytic Subunit - A Site for Introduction of Posttranslational Heterogeneities by Deamidation: D-Asp2 and D-isoAsp2 Containing Isoenzymes. *Protein Sci.* **9**, 2269-2277.

- Kmieciak, T.E., Shalloway, D. (1987) Activation and Suppression of pp60^{c-src} Transforming Ability by Mutation of Its Primary Sites of Tyrosin Phosphorylation. *Cell* **49**, 65-73.
- Krishna, R.G., Wold, F. (1998) In *Proteins: Analysis and Design*. Academic Press, San Diego, S. 121.
- Kriwacki, R.W., Siuzdak, G. (1998) Combined Use of Proteases and Mass Spectrometry in Structural Biology. *J. Biomol. Tech.* **9**, 5-15.
- Lanman, J., Tuma, R., Prevelige, P.E., Jr. (1999) Identification and Characterization of the Domain Structure of Bacteriophage P22 Coat Protein. *Biochemistry* **38**, 14614-14623.
- Larsen, M.R., Sorensen, G.L., Fey, S.J., Larsen, P.M., Roepstorff, P. (2001) Phospho-Proteomics: Evaluation of the Use of Enzymatic De-Phosphorylation and Differential Mass Spectrometric Peptide Mass Mapping for Site Specific Phosphorylation Assignment in Proteins Separated by Gel Electrophoresis. *Electrophoresis* **22**, 223-238.
- Lehmann, W.D. (1997) Pictograms for Experimental Parameters in Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **8**, 756-759.
- Lehmann, W.D. (1999) Electrospray Tandem MS-Studien von Phosphotyrosin-Peptiden. *32. DGMS-Tagung*, Oldenburg; 112.
- Lehmann, W.D., Bohne, A., von der Lieth, C.-W. (2000a) The Information Encrypted in the Accurate Mass of Peptides. *J. Mass Spectrom.* **35**, 1335-1341. (www.dkfz-heidelberg.de/spec/glypeps)
- Lehmann, W.D., Schlosser, A., Erben, G., Pipkorn, R., Bossemeyer, D., Kinzel, V. (2000b) Analysis of Isoaspartate in Peptides by Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Protein Sci.* **9**, 2260-2268.
- Lennon, J.J., Walsh, K.A. (1999) Locating and Identifying Posttranslational Modifications by In-Source Decay During MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Protein Sci.* **8**, 2487-2493.
- Lindorff-Larsen, K., Lerche, M.H., Poulsen, F.M., Roepstorff, P., Winther, J.R. (2001) Barley Lipid Transfer Protein, LTP1, Contains a New Type of Lipid-like Post-translational Modification. *J. Biol. Chem.* **276**, 33547-33553.

- Little, D.P., Speir, J.P., Sennko, M.W., O'Connor, P.B., McLafferty, F.W. (1994) Infrared Multiphoton Dissociation of Large Multiply Charged Ions for Biomolecules Sequencing. *Anal. Chem.* **66**, 2809-2815.
- Liu, T., Li, J.D., Zeng, R., Shao, X.X., Wang, K.Y., Xia, Q.C. (2001) Capillary Electrophoresis-Electrospray Mass Spectrometry for the Characterization of High-Mannose-Type N-Glycosylation and Differential Oxidation in Glycoproteins by Charge Reversal and Protease/Glycosidase Digestion. *Anal. Chem.* **73**, 5875-5885.
- Mann, M., Hojrup, P., Roepstorff, P. (1993) Use of Mass Spectrometric Molecular Weight Information to Identify Proteins in Sequence Databases. *Biol. Mass Spectrom.* **22**, 338-345.
- Mann, M., Wilm, M. (1994) Error-tolerant Identification of Peptides in Sequence Databases by Peptide Sequence Tags. *Anal. Chem.* **66**, 4390-4399.
- Marshall, A.G., Hendrickson, C.L., Jackson, G.S. (1998) Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry: a Primer. *Mass Spectrom. Rev.* **17**, 1-35.
- McBride, A.E., Silver, P.A. (2001) State of the Arg: Protein Methylation at Arginine Comes of Age. *Cell* **106**, 5-8.
- McLaughlin, S., Aderem, A. (1995) The Myristoyl-Electrostatic Switch - a Modulator of Reversible Protein-Membrane Interactions. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 272-276.
- McLachlin, D.T., Chait, B.T. (2001) Analysis of Phosphorylated Proteins and Peptides by Mass Spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 591-602.
- Medzihradsky, K.F., Campbell, J.M., Baldwin, M.A., Falick, A.M., Juhasz, P., Vestal, M.L., Burlingame, A.L. (2000) The Characteristics of Peptide Collision-induced Dissociation Using a High-Performance MALDI-TOF/TOF Tandem Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* **72**, 552-558.
- Meng, C.K., Mann, M., Fenn, J.B. (1988) *Zeitschrift für Physik D: Atoms, Molecules and Clusters* **10**, 361-368.
- Merrifield, R.B. (1963) Solid Phase Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149-2154.
- Metzger, S., Hoffmann, R. (2000) Studies on the Dephosphorylation of Phosphotyrosine-Containing Peptides During Post-Source Decay in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization. *J. Mass Spectrom.* **35**, 1165-1177.

- Morris, H.R., Paxton, T., Dell, A., Langhorne, J., Berg, M., Bordoli, R.S., Hoyes, J., Bateman, R.H. (1996) High Sensitivity Collisionally-activated Decomposition Tandem Mass Spectrometry on a Novel Quadrupol/Orthogonal-acceleration Time-of-Flight Mass Spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 889-896.
- Morris, H.R., Paxton, T., Panico, M., McDowell, R., Dell, A. (1997) A Novel Geometry Mass Spectrometer, the Q-TOF, for Low-femtomole/attomole-range Biopolymer Sequencing. *J. Protein Chem.* **16**, 469-479.
- Muhlberg, A.B., Schmid, S.L. (2000) Domain Structure and Function of Dynamin Probed by Limited Proteolysis. *Methods* **20**, 475-483.
- Muhlberg, A.B., Warnock, D.E., Schmid, S.L. (1997) Domain Structure and Intramolecular Regulation of Dynamin GTPase. *EMBO J.* **16**, 6676-6683.
- Murakami, T., Nojiri, M., Nakayama, H., Odaka, M., Yohda, M., Dohmae, N., Takio, K., Nagamune, T., Endo, I. (2000) Post-translational Modification is Essential for Catalytic Activity of Nitrile Hydratase. *Protein Sci.* **9**, 1024-1030.
- Naito, C., Kajita, M., Niwa, T. (1999) Determination of Glutathionyl Hemoglobin in Hemodialysis Patients Using Electrospray Ionization Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chrom. B* **731**, 121-124.
- Nalivaeva, N.N., Turner, A.J. (2001) Post-translational Modifications of Proteins: Acetylcholinesterase as a Model System. *Proteomics* **1**, 735-747.
- Neubauer, G., Mann, M. (1999) Mapping of Phosphorylation Sites of Gel-Isolated Proteins by Nanoelectrospray Tandem Mass Spectrometry: Potentials and Limitations. *Anal. Chem.* **71**, 235-242.
- Nielsen, M.L., Bennett, K.L., Larsen, B., Moniatte, M., Mann, M. (2002) Peptide End Sequencing by Orthogonal MALDI Tandem Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* in press.
- Niemann, H.H., Knetsch, M.L.W., Scherer, A., Manstein, D.J., Kull, F.J. (2001) Crystal Structure of a Dynamin GTPase Domain in both Nucleotide-free and GDP-bound Forms. *EMBO J.* **20**, 5813-5821.
- Nishida, E., Gotoh, Y. (1993) The MAP Kinase Cascade is Essential for Diverse Signal Transduction Pathways. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 123-130.

- Noren, C.J., Wang, J., Perler, F.B. (2000) Protein-Spleißen: Mechanismus und Anwendungen. *Angew. Chem.* **112**, 458-476.
- Nuwaysir, L.M., Stults, J.T. (1993) Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Phosphopeptides Isolated by On-line Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **4**, 662-669.
- Oda, Y., Nagasu, T., Chait, B.T. (2001) Enrichment Analysis of Phosphorylated Proteins as a Tool for Probing the Phosphoproteome. *Nat. Biotechnol.* **19**, 379-382.
- O'Hair, R.A. (2000) The Role of Nucleophile-Electrophile Interactions in the Unimolecular and Bimolecular Gas-Phase Ion Chemistry of Peptides and Related Systems. *J. Mass Spectrom.* **35**, 1377-1381.
- Olsen, S.R., Uhler, M.D. (1989) Affinity Purification of the C α and C β Isoforms of the Catalytic Subunit of cAMP-dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* **264**, 18662-18666.
- Pappin, D.J.C., Hojrup, P., Bleasby, A.J. (1993) Rapid Identification of Proteins by Peptide-Mass Fingerprinting. *Current Biology* **3**, 327-332.
- Paul, W., Raether, M. (1955) Das elektrische Massenfilter. *Z. Phys.* **140**, 262-273.
- Paul, W. (1990) Electromagnetic Traps for Charged and Neutral Particles (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **29**, 739-748.
- Pelech, S.L. (1993) Networking with Protein Kinases. *Curr. Biol.* **3**, 513-515.
- Pepperkok, R., Hotz-Wagenblatt, A., König, N., Girod, A., Bossemeyer, D., Kinzel, V. (2000) Intracellular Distribution of Mammalian Protein Kinase A Catalytic Subunit Altered by Conserved Asn2 Deamidation. *J. Cell Biol.* **148**, 715-726.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M, Cottrell, J.S. (1999) Probability-based Protein Identification by Searching Sequence Databases Using Mass Spectrometry Data. *Electrophoresis* **20**, 3551-3567.
- Pettersson, A.S., Steen, H., Kalume, D.E., Caidahl, K., Roepstorff, P. (2001) Investigation of Tyrosine Nitration in Proteins by Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **36**, 616-625.
- Plowman, G.D., Sudarsanam, S., Bingham, J., Whyte, D., Hunter, T. (1999) The Protein Kinases of *Caenorhabditis elegans*: A Model for Signal Transduction in Multicellular Organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 13603-13610.

- Polce, M.J., Ren, D., Wesdemiotis, C. (2000) Dissociation of the Peptide Bond in Protonated Peptides. *J. Mass Spectrom.* **35**, 1391-1398.
- Polevoda, B., Sherman, F. (2000) N-terminal Acetylation of Eukaryotic Proteins. *J. Biol. Chem.* **275**, 36479-36482.
- Porter, J.A., Young, K.E., Beachy, P.A. (1996) Cholesterol Modification of Hedgehog Signaling Proteins in Animal Development. *Science* **274**, 255-259.
- Posewitz, M.C., Tempst, P. (1999) Immobilized Gallium(III) Affinity Chromatography of Phosphopeptides. *Anal. Chem.* **71**, 2883-2892.
- Rappsilber, J., Steen, H., Mann, M. (2001) Labile Sulfogroup Allows Differentiation of Sulfotyrosine and Phosphotyrosine in Peptides. *J. Mass Spectrom.* **36**, 832-833.
- Roepstorff, P., Fohlmann, J. (1984) Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass Spectra of Peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* **11**, 601.
- Schlosser, A., Lehmann, W.D. (2000) Five-membered Ring Formation in Unimolecular Reactions of Peptides: A Key Structural Element Controlling low-Energy Collision-induced Dissociation of Peptides. *J. Mass Spectrom.* **35**, 1382-1390.
- Schlosser, A., Lehmann, W.D. (2001) N-terminal Peptide Sequencing by Q-TOF Tandem Mass Spectrometry and Accurate Mass Determination of Low-mass b Ions. *4th Proc. ASMS Conf. Mass Spectrom. Allied Top.*, Chicago, IL, USA.
- Schlosser, A., Lehmann, W.D. (2002) Patchwork Peptide Sequencing: Extraction of Sequence Information from Accurate Mass Data of Peptide Tandem Mass Spectra Recorded at High Resolution. *Proteomics* **2**, 524-533.
- Schmelzeisen-Redecker, G., Bütfering, L., Röllgen, F.W. (1989) Desolvation of Ions and Molecules in Thermospray Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **90**, 139-150.
- Schnölzer, M., Lehmann, W.D. (1997) Identification of Modified Peptides by Metastable Fragmentation in MALDI Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **169/170**, 263-271.
- Schuhmacher, M., Glocker, M.O., Wunderlin, M., Przybylski, M. (1996) Direct Isolation of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Analysis by Electrospray-Ionization Mass Spectrometry. *Electrophoresis* **17**, 848-854.
- Seger, R., Krebs, E.G. (1995) The MAPK Signaling Cascade. *FASEB J.* **9**, 726-735.

- Shi, S.D., Hemling, M.E., Carr, S.A., Horn, D.M., Lindh, I., McLafferty F.W. (2001) Phosphopeptide/Phosphoprotein Mapping by Electron Capture Dissociation Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **73**, 19-22.
- Shoji, S., Titani, K., Demaille, J.G., Fischer, E.H. (1979) Sequence of Two Phosphorylated Sites in the Catalytic Subunit of Bovine Cardiac Muscle Adenosine 3':5'-Monophosphate-dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* **254**, 6211-6214.
- Shukla, A.K., Futrell, J.H. (2000) Tandem Mass Spectrometry: Dissociation of Ions by Collisional Activation. *J. Mass Spectrom.* **35**, 1069-1090.
- Sogaard, M., Andersen, J.S., Roepstorff, P., Svensson, B. (1993) Electrospray Mass Spectrometry Characterization of Post-Translational Modifications of Barley α -Amylase 1 Produced in Yeast. *Biotechnology* **11**, 1162-1165.
- Spaulding, S.V. (1993) The Ways in which Hormones Change Cyclic Adenosine 3,5-Monophosphate-dependent Protein Kinase Subunits, and how such Changes Affect Cell Behavior. *Endocr. Rev.* **14**, 632-650.
- Steen, H., Küster, B., Mann, M. (2001a) Quadrupole Time-of-Flight versus Triple-Quadrupole Mass Spectrometry for the Determination of Phosphopeptides by Precursor Ion Scanning. *J. Mass Spectrom.* **36**, 782-790.
- Steen, H., Küster, B., Fernandez, M., Pandey, A., Mann, M. (2001b) Detection of Tyrosine Phosphorylated Peptides by Precursor Ion Scanning Quadrupole TOF Mass Spectrometry in Positive Ion Mode. *Anal. Chem.* **73**, 1440-1448.
- Stensballe, A., Jensen, O.N., Olsen, J.V., Haselmann, K.F., Zubarev, R.A. (2000) Electron Capture Dissociation of Singly and Multiply Phosphorylated Peptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 1793-1800.
- Stensballe, A., Andersen, S., Jensen, O.N. (2001) Characterization of Phosphoproteins from Electrophoretic Gels by Nanoscale Fe(III) Affinity Chromatography with Offline Mass Spectrometry Analysis. *Proteomics* **1**, 207-222.
- Stephenson, J.L., Jr., McLuckey, S.A. (1998) Simplification of Product Ion Spectra Derived from Multiply Charged Ions via Ion/Ion Chemistry. *Anal. Chem.* **70**, 3533-3544.
- Stock, J.B., Ninfa, A.J., Stock, A.M. (1989) Protein Phosphorylation and Regulation of Adaptive Responses in Bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**, 450-490.

- Taniuchi, H., Anfinsen, C.B. (1969) An Experimental Approach to the Study of the Folding of Staphylococcal Nuclease. *J. Biol. Chem.* **244**, 3864-3875.
- Thiede, B., Lamer, S., Mattow, J., Siejak, F., Dimmler, C., Rudel, T., Jungblut, P.R. (2000) Analysis of Missed Cleavage Sites, Tryptophan Oxidation and N-terminal Pyroglutamylolation after in-gel Digestion. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 496-502.
- Tholey, A., Reed, J., Lehmann, W.D. (1998) Electrospray Tandem Mass Spectrometric Studies of Phosphopeptides and Phosphopeptide Analogues. *J. Mass Spectrom.* **34**, 117-123.
- Thomson, B.A., Iribane, J.V. (1979) Field Induced Ion Evaporation from Liquid Surfaces at Atmospheric Pressure. *J. Chem. Phys.* **71**, 4451-4463.
- Tomomura, A. (1998) Pancreatic Elastase. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*; Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, F.D. (Eds.). Academic Press, San Diego, S. 42-46.
- Toner-Webb, J., van Patten, S.M., Walsh, D.A., Taylor, S.S. (1992) Autophosphorylation of the Catalytic Subunit of cAMP-dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* **267**, 25174-25180.
- van der Geer, P., Luo, K., Sefton, B.M., Hunter, T. (1999) Phosphopeptide Mapping and Phosphoamino Acid Analysis on Cellulose Thin-Layer Plates. In *Protein Phosphorylation: a Practical Approach, edn 2*; Hardie, D.G. (Ed.). Oxford University Press, Oxford, S. 97-126.
- Venter et al. (2001) The Sequence of the Human Genome. *Science* **291**, 1304-1351.
- Verma, R., Annan, R.S., Huddleston, M.J., Carr, S.A., Reynard, G., Deshaies, R.J. (1997) Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk Required for its Degradation and Entry into S Phase. *Science* **278**, 455-460.
- Vorm, O., Roepstorff, P., Mann, M. (1994) Improved Resolution and very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation. *Anal. Chem.* **66**, 3281-3287.
- Wade, P.A., Pruss, D., Wolffe, A.P. (1997) Histone Acetylation: Chromatin in Action. *Trends Biochem. Sci.* **256**, 128-132.
- Watts, J.D., Affolter, M., Krebs, D.L., Wange, R.L., Samelson L.E., Aebersold, R. (1994) Identification by Electrospray Ionization Mass Spectrometry of the Sites of Tyrosine Phosphorylation Induced in Activated Jurkat T Cells on the Protein Tyrosine Kinase ZAP-70. *J. Biol. Chem.* **269**, 29520-29529.

- Watty, A., Neubauer, G., Dreger, M., Zimmer, M., Wilm, M., Burden, S.J. (2000) The *in vitro* and *in vivo* Phosphotyrosine Map of Activated MuSK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4585-4590.
- Weinberg, R.A. (1995) The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control. *Cell* **81**, 323-330.
- Wilm, M., Mann, M. (1994) Electrospray and Taylor-Cone Theory, Dole's Beam of Macromolecules at Last? *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **136**, 167-180.
- Wilm, M., Mann, M. (1996) Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source. *Anal. Chem.* **68**, 1-8.
- Wilm, M., Neubauer, G., Mann, M. (1996) Parent Ion Scans of Unseparated Peptide Mixtures. *Anal. Chem.* **68**, 527-533.
- Wind, M., Edler, M., Jakubowski, N., Linscheid, M., Wesch, H., Lehmann, W.D. (2001a) Analysis of Protein Phosphorylation by Capillary Liquid Chromatography Coupled to Element Mass Spectrometry with ^{31}P Detection and Electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **73**, 29-35.
- Wind, M., Wesch, H., Lehmann, W.D. (2001b) Protein Phosphorylation Degree: Determination by Capillary Liquid Chromatography and Inductively Coupled Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **73**, 3006-3010.
- Wienke, D.C., Knetsch, M.L.W., Neuhaus, E.M., Reedy, M.C., Manstein, D.J. (1999) Disruption of a Dynamin Homologue Affects Endocytosis, Organelle Morphology, and Cytokinesis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell* **10**, 225-243.
- Wysocki, V.H., Tsaprailis, G., Smith, L.L., Brei, L.A. (2000) Mobile and Localized Protons: a Framework for Understanding Peptide Dissociation. *J. Mass Spectrom.* **35**, 1399-1406.
- Xiang, F., Beavis, R.C. (1994) A Method to Increase Contaminant Tolerance in Protein Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization by the Fabrication of Thin Protein-doped Polycrystalline Films. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8**, 199-204.
- Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M.J., Harrison, S.C. (1999) Crystal Structures of c-Src Reveal Features of its Autoinhibitory Mechanism. *Mol. Cell* **3**, 629-638.
- Yague, J., Vazquez, J., Lopez de Castro, J. (2000) A Post-Translational Modification of Nuclear Proteins, N^G, N^G -Dimethyl-Arg, Found in a Natural HLA Class I Peptide Ligand. *Protein Sci.* **9**, 2210-2217.

- Yates, J.R. III, Speicher, S., Griffin, P.R., Hunkapiller, T. (1993) Peptide Mass Maps: a Highly Informative Approach to Protein Identification. *Anal. Biochem.* **214**, 397-408.
- Yan, J.X., Packer, N.H., Gooley, A.A., Williams, K.L. (1998) Protein Phosphorylation: Technologies for the Identification of Phosphoamino Acids. *J. Chromatogr. A* **808**, 23-41.
- Yefimov, S., Yergey, A.L., Chrambach, A. (2000) Transfer of SDS-Proteins from Gel Electrophoretic Zones into Mass Spectrometry, Using Electroelution of the Band into Buffer without Sectioning of the Gel. *J. Biochem. Biophys. Methods* **42**, 65-78.
- Yonemoto, W., McGlone, M.L., Taylor, S.S. (1993) Identification of Phosphorylation Sites in the Recombinant Catalytic Subunit of cAMP-dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* **268**, 2348-2352.
- Yost, R.A., Enke, C.G. (1979) Triple Quadrupole Mass Spectrometry for Direct Mixture Analysis and Structure Elucidation. *Anal. Chem.* **51**, 1251A-1264A.
- Young, J.D., Lawrence, A.J., MacLean, A.G., Leung, B.P., McInnes, I.B., Canes, B., Pappin, D.J.C., Stevenson, R.D. (1999) Thymosin β 4 Sulfoxide is an Anti-inflammatory Agent Generated by Monocytes in the Presence of Glucocorticoids. *Nat. Med.* **5**, 1424-1427.
- Zamfir, A., Peter-Katalinic, J. (2001) Glycoscreening by on-line Sheathless Capillary Electrophoresis/electrospray Ionization-Quadrupole Time of Flight-Tandem Mass Spectrometry. *Electrophoresis* **22**, 2448-2457.
- Zhou, W., Merrick, B.A., Khaledi, M.G., Tomer, K.B. (2000) Detection and Sequencing of Phosphopeptides Affinity Bound to Immobilized Metal Ion Beads by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **11**, 273-282.
- Zhou, H., Watts, J.D., Aebersold, R. (2001) A Systematic Approach to the Analysis of Protein Phosphorylation. *Nat. Biotechnol.* **19**, 375-378.
- Zobel-Thropp, P., Yang, M.C., Machado, L., Clarke, S. (2000) A Novel Post-translational Modification of Yeast Elongation Factor 1A: Methylsterification at the C Terminus. *J. Biol. Chem.* **275**, 37150-37158.
- Zubarev, R.A., Kelleher, N.L., McLafferty, F.W. (1998) Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 3265-3266.

Anhang

Sequenzen analysierter Proteine

P00517: cAMP-Dependent protein kinase, alpha-catalytic subunit (Bos taurus)

GNAAAAKKGS EQESVKEFLA KAKEDFLKKW ENPAQNTAHL DQFERIKTLG TGSFGRVMLV
KHKATEGHYA MKILDKQKVV KLKQIEHTLN EKRIQLQAVNF PFLVKLEFSF KDNSNLYMVM
EYVPGGEMFS HLRRIGRFSE PHARFYAAQI VLTFEYLHSL DLIYRDLKPE NLLIDHQGYI
QVTDFGFAKR VKGRWTWLCG TPEYLAPEII LSKGYNKAVD WWALGVLIYE MAAGYPPFFA
DQPIQIYEKI VSGKVRFP SH FSSDLKDLLR NLLQVDLTKR FG NLKNGVND IKNHKWFATT
DWIAIYQRKV EAPFIPKFKG PGDTSNFDDY EEEEIRVSIN EKCGKEFSEF

P05131: cAMP-Dependent protein kinase, beta-catalytic subunit (Bos taurus)

GNAATAKKGS EVESVKEFLA KAKEDFLKKW ENPAPNAGL EDFERKKTG TGSFGRVMLV
KHKATEQYYA MKILDKQKVV KLKQIEHTLN EKRIQLQAVNF PFLVRLEYAF KDNSNLYMVM
EYVPGGEMFS HLRRIGRFSE PHARFYAAQI VLTFEYLHSL DLIYRDLKPE NLLIDHQGYI
QVTDFGFAKR VKGRWTWLCG TPEYLAPEII LSKGYNKAVD WWALGVLIYE MAAGYPPFFA
DQPIQIYEKI VSGKVRFP SH FSSDLKDLLR NLLQVDLTKR FG NLKNGVSD IKTHKWFATT
DWIAIYQRKV EAPFIPKFRG SGTDSNFDDY EEEDIRVSIT EKCGKEFCEF

Q94464: Dynamin A (Dictyostelium discoideum)

MDQLIPVINK LQDVFNLTGS DPLDLPQIVV VGSQSSGKSS VLENIVGRDF LPRGSGIVTR
RPLILQLTHL PIADDSQTQ EWGEFLHKPN DMFYDFSEIR EEIIRDTRM TGKNGKISAQ
PINLKIYSPH VVNLTLVDLP GITKVPVGDQ PTDIEQQIRR MVMAYIKKQN AIIIVAVTPAN
TDLANSDALQ LAKEVDPEGK RTIGVITKLD LMDKGTDAME VLTGRVIPLT LGFIGVINRS
QEDIIAKSKI RESLKSEILY FKNHPIYKSI ANRSGTAYLS KTLNKLLMFH IRDTLPDLKV
KVKMLSDVQ GELSTYGDPL YDTKNSQGAL LLQIITIFSS NFKDAIDGKL TDLSNNELYG
GARISYIFNE IYSHCVNNID PLEGISLNDI RTTMRNATGP RAALFIPEIS FELLVKKQVV
RLEEPSAQC V EYVYDELQRI VSQLEAKELS RFINLKARVI EVVNNLLQKH KVP TKTMIEH
LIKIETAFIN TSHPDFVGG E GIFESLYKKQ QLQQQNHLQQ LQDQYQQQQQ QQQQQQQQNG
INNNQKGDNG NMNVNQNMN QQNMNQNQS TNPFLQQQQQ GQNKYPGGPP AQQQPNQQPN
QLNKGPNMP PNQSKPSSIP QNGPNNNNNN NNNNNRQDHQ QGSFFSSFFR ASPDPSLGQY
GGANNSNSN NPTSPINSSS NSGNNTYTFG GQQSSSSSSQ QLQSSSSQY KTSYNNNNNS
SSNNSYNRY QDDFYGRGDK LNQVPSIIKA PDDLTSKEKF ETELIRELLI SYFNIVKKNV
KDSVPKSI MH FLVNQSKEHI QNELVAALYK EELFDELLEE SPQISSKRKS CKAMIEILRK
ANEIINEIRD FRN

Q9H4G4: 17kD Protein (GAPR-1) (Homo sapiens)

MGKSASKQFH NEVLKAHNEY RQKHGVPPLK LCKNLNREAQ QYSEALASTR ILKHSPESSR
GQCENLAWA SYDQTGKEVA DRWYSEIKNY NFQQPGFTSG TGHFTAMVWK NTKKMGVGKA
SASDGSSFVV ARYFPAGNVV NEGFEEENVL PPKK

Q9H4F0: Transcription initiation factor IA protein (Homo sapiens)

MAAPLLHTRL PGDAAASSSA VKKLGASRTG ISNMRALEND FFNSPPRKTV RFGGTVTEVL
LKYKKGETND FELLNQQLLD PDIKDDQIIN WLEFRSSIM YLTKDFEQLI SIILRLPWLN
RSQTVVEEYL AFLGNLVSQA TVFLRPCLSM IASHFVPPRV IIEKGDVDVS DSDEDDNLP
ANFDTCHRAL QIIARYVPST PWFLMPILVE KFPFVRKSER TLECYVHLL RISVYFPTLR
HEILELIEK LLKLDVNASR QGIEDAEETA TQTCGGTDST EGLFNMEDE ETEHETKAGP
ERLDQMVHPV AERLDILMSL VLSYMKDVCY VDGVKVDNGKT KDLYRDLINI FDKLLLPHTA
SCHVQFFMFY LCSFKLGFAE AFLEHLWKKL QDPSNPAIIR QAAGNYIGSF LARAKFIPLI
TVKSCDLLV NWLHIYLNQ DSGTKAFCDV ALHGPFYSAC QAVFYXFVFR HKQLLSGNLK
EGLQYLQSLN FERIVMSQLN PLKICLPSV NFFAAITNKY QLVFCYTIIE RNNRQMLPVI
RSTAGGDSVQ ICTNPLDTFF PFDPCVLKRS KKFIDPIYQV WEDMSAEELQ EFKKPMKKDI
VEDEDDFLK GEVPQNDTVI GITPSSFDTH FRSPSSSVGS PPVLYMQPSP L

Verwendete Abkürzungen

CE	Capillary Electrophoresis
CID	Collision Induced Dissociation
DTT	Dithiothreitol
ECD	Electron Capture Dissociation
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	Electrospray Ionization
eV	electron volt
FTICR	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
IRMPD	Infrared Multi Photon Dissociation
LDS	Lithium Dodecylsulfat
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
MS	Massenspektrometrie
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
ppm	parts per million
Q	Quadrupol
rpm	rotations per minute
SDS	Sodium Dodecylsulfat
TOF	Time of Flight

Publikationen

Lehmann, W.D., Schlosser, A., Erben, G., Pipkorn, R., Bossemeyer, D., Kinzel, V. (2000) Analysis of Isoaspartate in Peptides by Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Prot. Sci.* **9**, 2260-2268.

Schlosser, A., Lehmann, W.D. (2000) Five-Rings in Monomolecular Reactions of Peptides: a Key Structural Element Controlling Low-Energy Collision-induced Dissociation of Peptides. *J. Mass Spectrom.* **35**, 1382-1390.

Schlosser, A., Pipkorn, R., Bossemeyer, D., Lehmann, W.D. (2001) Analysis of Protein Phosphorylation by Combination of Elastase Digest and Neutral Loss Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **73**, 170-176.

Eberle, H.B., Serrano, R.L., Füllekrug, J., Schlosser, A., Lehmann, W.D., Lottspeich, F., Kaloyanova, D., Wieland, F.T., Helms, J.B. (2002) Identification and Characterization of a Novel Human Plant-Pathogenesis Related Protein that Localizes to Lipid-enriched Microdomains in the Golgi Complex. *J. Cell Sci.* **15**, 827-838.

Schlosser, A., Lehmann, W.D. (2002) Patchwork Peptide Sequencing - Extraction of Sequence Information from Accurate Mass Data of Peptide Tandem Mass Spectra Recorded at High Resolution. *Proteomics* **2**, 524-533.

Schlosser, A., Bodem, J., Bossemeyer, D., Grummt, I., Lehmann, W.D. (2002) Identification of Protein Phosphorylation Sites by Combination of Elastase Digestion, Immobilized Metal Affinity Chromatography, and Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry. *Proteomics* in press.

Schlosser, A., Klockow, B., Manstein, D.J., Lehmann, W.D. (2002) Characterization of Domain Structure and Post-translational Modifications of Dynamin A from *Dictyostelium discoideum*. In preparation.

Konferenzbeiträge

Schlosser, A., Pipkorn, R., Bossemeyer, D., Lehmann, W.D. (1999) Analyse der Desamidierung von Peptiden und Proteinen mit negativ-Ionen ESI-MS/MS. *32. Diskussionstagung der DGMS*, Oldenburg.

Schlosser, A., Pipkorn, R., Bossemeyer, D., Lehmann, W.D. (2000) Analyse der Proteinphosphorylierung durch Kombination von Elastase-Verdau und ESI-Tandem-Massenspektrometrie. *33. Diskussionstagung der DGMS*, Berlin.

Schlosser, A., Pipkorn, R., Bossemeyer, D., Lehmann, W.D. (2000) Protein Phosphorylation at Serine and Threonine Analyzed by Elastase Digestion and Tandem Mass Spectrometry with Neutral Loss Scanning. *48th Proc. ASMS Conf. Mass Spectrom. Allied Top.*, Long Beach, CA, USA.

Schlosser, A., Bossemeyer, D., Lehmann, W.D. (2001) Protein Phosphorylation Studied by Low-Specificity Proteases and Tandem Mass Spectrometry. *34. Diskussionstagung der DGMS*, München.

Schlosser, A., Bossemeyer, D., Lehmann, W.D. (2001) Protein Phosphorylation Studied by Combination of IMAC and Data-Dependent Acquisition of nanoESI Q-TOF Product-Ion Spectra. *49th Proc. ASMS Conf. Mass Spectrom. Allied Top.*, Chicago, IL, USA.

Schlosser, A., Lehmann, W.D. (2001) N-terminal Peptide Sequencing by Q-TOF Tandem Mass Spectrometry and Accurate Mass Determination of Low-mass b Ions. *49th Proc. ASMS Conf. Mass Spectrom. Allied Top.*, Chicago, IL, USA.

Schlosser, A., Lehmann, W.D. (2002) Patchwork Peptide Sequencing - Exhaustive Extraction of Sequence Information from Peptide MS/MS Spectra. *35. Diskussionstagung der DGMS*, Heidelberg.

LEBENS LAUF

Andreas Schlosser

Persönliche Daten

Geboren: 06.12.1970
Geburtsort: Neuendettelsau
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Name der Mutter: Maria Schlosser
Name des Vaters: Georg Schlosser
Familienstand: ledig

Ausbildung

1977 - 1981 Grundschohlausbildung an der Bismarckschule in Nürnberg
1981 - 1990 Gymnasialausbildung am Hans-Sachs-Gymnasium in Nürnberg
1990 - 1991 Wehrdienst, Zivildienst
1991 - 1998 Studium der Chemie an der Universität Bayreuth
Juli 1998 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie (Prof. M. Sprinzl)
Thema: „Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur Aminoacylierung von tRNA“
1998 - 2002 Promotion an der Johann Wolfgang Goethe-Universität (Frankfurt am Main) als externer Doktorand von Prof. M. Karas (Instrumentelle Analytische Chemie), durchgeführt am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg (Prof. W.D. Lehmann, Zentrale Spektroskopie und Prof. V. Kinzel, Abteilung für Pathochemie)
Thema: „Analyse der Proteinphosphorylierung und anderer kovalenter Proteinmodifikationen mit Elektrospray-Massenspektrometrie“

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Lehmann für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Ich bin ihm dankbar für seine stete Diskussionsbereitschaft und dafür, dass er mich immer darin unterstützt hat meine eigenen Ideen zu verwirklichen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Kinzel und Dr. Bossemeyer für ihre Unterstützung bei proteinchemischen Fragen und für die Überlassung von interessanten Proteinproben bedanken.

Zu Dank verpflichtet fühle ich mich auch Prof. Karas für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis als externer Mitarbeiter.

Für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft möchte ich mich ganz besonders bei Norbert König bedanken. Er hat mir den Alltag im Labor ganz wesentlich erleichtert.

Das Leben in- und außerhalb des Labors haben mir meine Kollegen Richard Gminski, Mathias Wind, Thorsten Schneider, Karin Bettinger, Michael Gaßel, Mogjib Salek und Anna Lisa Picciolo erleichtert und bereichert.

Für ihre unablässige Jagd, nach überflüssigen Satzzeichen, möchte ich mich, bei Stephanie Lamer, bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich es nicht versäumen mich auch bei meinen Eltern zu bedanken, denn ohne ihre unermüdliche Unterstützung während meiner gesamten Ausbildungszeit wäre mein Weg sehr viel beschwerlicher gewesen.



Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation

„Analyse der Proteinphosphorylierung und anderer kovalenter Proteinmodifikationen mit Elektrospray-Massenspektrometrie“

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schriften bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, 27. April 2002

Andreas Schlosser