



Strukturanalyse von Proteinen mittels Hydroxylradikal Footprinting und Crosslinking kombiniert mit hochauf- lösender Massenspektrometrie

Master Arbeit

28.August 2012

Autor:

Tommy Hofmann

Tutor:

Dr. rer. nat. Stefan Kalkhof
Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung - UFZ
Department Proteomik

Prof. Dr. rer. nat. Dirk Labudde
Hochschule Mittweida

Die experimentellen Arbeiten dieser Masterarbeit wurden von Januar 2012 bis August 2012 am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ, Leipzig durchgeführt. Die Betreuung der Arbeit übernahmen Dr. Stefan Kalkhof und Prof. Dr. Dirk Labudde. Die Maserarbeit wurde an der Hochschule Mittweida, Fakultät für Mathematik, Naturwissenschaften und Informatik, Fachgruppe Biotechnologie verteidigt.

Gutachter: Prof. Dr. Dirk Labudde
Dr. Stefan Kalkhof

Abstract

Massenspektrometrie basierte Methoden zur Untersuchung von Strukturen von Proteinen und Proteinkomplexen zeigten besonders in den letzten Jahren bei bestimmten Fragestellungen gravierende Vorteile gegenüber den Standardmethoden der hochauflösenden Strukturaufklärung (NMR und Röntgenkristallographie). Besonders ihre schnelle Durchführbarkeit und der geringe Bedarf an Material machen sie attraktiv. Auch wenn die Daten keine hochauflösende Strukturaufklärung erlauben, können sie effizient zur Unterstützung von Strukturmodellierungen eingesetzt werden oder ermöglichen eine effiziente Validierung von bioinformatisch erzeugten Strukturmodellen oder die Lokalisierung von Bindungsstellen in Proteinkomplexen. Viele Molekülgruppen lassen sich experimentell nicht in der NMR oder der Röntgenkristallographie auflösen, Proteinkomplexe sind oft zu groß für die NMR und Proteinkristalle bilden sich nur unter raren, komplexen Bedingungen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Techniken des Hydroxylradikal Proteinfootprinting auf das Standardprotein Betalactoglobulin angewandt. Während Hydroxylradikal Proteinfootprinting Aussagen über die Oberflächenzugänglichkeit ermöglichen, wurde Chemisches Crosslinking verwendet, um Abstandsinformationen in der Struktur von Betalactoglobulin zu generieren. Im Rahmen dieser Masterarbeit wurde die Methodik des Hydroxylradikal Proteinfootprinting optimiert und die erhaltenen Resultate mit Literaturwerten sowie den Ergebnissen des Chemischen Crosslinkings verglichen.

Danksagung

Für die Unterstützung bei der Arbeit an meiner Masterarbeit möchte ich mich bei folgenden Personen.

Für sechs Semester ausgezeichnete Lehre und für die besondere Beziehung zu seinen Studenten, die uns alle oft inspiriert hat, meinem Hochschulbetreuer Prof. Dr. Dirk Labudde (Hochschule Mittweida).

Für die Gelegenheit viel lernen zu dürfen, seine fachliche Kompetenz, die intensive Betreuung und die lockere, freundliche Atmosphäre, meinem Zweitbetreuer Dr. Stefan Kalkhof (Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung UFZ).

Für die Möglichkeit den Elektronenbeschleuniger des IOM nutzen zu dürfen und ihre immer kompetente und freundliche Hilfe, Dr. Christian Elsner und Dr. Wolfgang Knolle (IOM Leipzig).

Für die Möglichkeit meine Abschlussarbeit im Department Proteomik schreiben zu dürfen, Dr. Martin von Bergen (Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung UFZ).

Bei meinen vielen freundlichen und kompetenten Kollegen und Kommilitonen die immer bereit waren mir zu helfen.

Meinen Freunden und Leidensgenossen.

Und vor allem meiner lieben Großmutter für ihre immerwährende Unterstützung in jeder Lebens Lage die es mir erst ermöglicht hat meinen Berufswunsch wahr werden zu lassen.

Ich widme diese Arbeit meiner Mutter, Annett Hofmann.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	iv
Tabellenverzeichnis	vii
Abbildungsverzeichnis	viii
Abkürzungsverzeichnis	ix
1 Einleitung	10
1.1 Proteinstrukturaufklärung	10
1.2 Zielstellung	14
2 Hintergrund	15
2.1 Massenspektrometrie.....	15
2.1.1 MS/MS bzw. Tandem-Massenspektrometrie.....	15
2.1.2 Orbitrap Massenspektrometer	16
2.2 MS-basierte Proteinstrukturaufklärung	17
2.2.1 Chemisches Crosslinking	17
2.2.2 Bedingungen für Chemisches Crosslinking.....	18
2.2.3 Auswertung der Experimente	19
2.3 Hydroxyl-Radikal Proteinfootprinting	20
2.3.1 Chemie des Hydroxyl Radikal Protein Footprinting ..	22
2.3.2 Aufbau und Auswertung eines RP-Experiments.....	26
3 Material und Methoden	29
3.1 Chemikalien und Proteine	29
3.2 Geräte	30
3.3 Software	30
3.4 Experimente.....	31
3.4.1 Vorbereitung Protein- und Pufferlösungen.....	31
3.4.2 Gasaustausch.....	32
3.4.3 Bestrahlung	32
3.4.4 Bestimmung der effektiven Dosis mittels Alexa 488	33
3.4.5 1D-SDS-Page	33
3.4.6 Tryptischer In-Gel Verdau.....	33
3.4.7 Tryptischer in-Lösungsverdau	35
3.4.8 Nano-Hochleistungsflüssigchromatographie/nano- Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie	35
3.4.9 Datenauswertung und Software.....	36
3.4.10 Untersuchung des Calmodulin/Melittin-Komplexes..	37
3.5 Crosslinking Experiment.....	39
3.5.1 Crosslinking Reaktion.....	39
3.5.2 Aceton Fällung.....	39
3.5.3 Tryptischer Lösungsverdau	40

3.5.4	LC-MS und MS/MS	40
3.5.5	Datenauswertung und Software.....	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Optimierung der Bestrahlungsintensität.....	41
4.2	Einfluss des Proteinsystems	42
4.3	Einfluss der Probenbegasung	43
4.4	Sequenzabdeckung und Intensität.....	44
4.5	Aussagen bzgl. der Oberflächenzugänglichkeit basierend ... auf der Intensitätsabnahme unmodifizierter Peptide	45
4.6	Relative Quantifizierung der modifizierte Peptide und Identifikation der Oxidationsstelle.....	48
4.7	Crosslinking-Experimente mit dem Crosslinker EDC.....	52
5	Diskussion	55
5.1	Energiedosis und Proteinsystem.....	55
5.2	Probenbegasung	56
5.3	Sequenzabdeckung und Intensität.....	57
5.4	Verlust unmodifizierter Peptide.....	59
5.5	Identifizierte Modifikationen und Dynamik oxidierter Peptide.....	60
6	Zusammenfassung	67
Quellen	lxix

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reaktionen von Wasser beim Kontakt mit der Bremsstrahlung beschleunigter Elektronen	23
Tabelle 2: Massenshift's, chemische Modifikation und Reaktionsgeschwindigkeit der in der Literatur erschienenen, detektierten Aminosäuren welche mit Hydroxylradikalen reagieren	24
Tabelle 3: Chemikaliertabelle	29
Tabelle 4: Proteine	30
Tabelle 5: Geräte	30
Tabelle 6: Software	30
Tabelle 7: Probentabelle 1	37
Tabelle 8: Probentabelle 2	38
Tabelle 9a: Probentabelle 3, erste Messreihe	38
Tabelle 9b: Probentabelle 3, zweite Messreihe	39
Tabelle 10: Sequenzabdeckung bei verschiedenen Dosen in allen Experimenten	45
Tabelle 11: Gefundene modifizierte Peptide und Modifikationsstellen mit XCorr	51
Tabelle 12: Mittels StavroX2.0.6 und Validierung der MS/MS-Spektren ausgewählte Crosslinking-Kandidaten	53
Tabelle 13: Mittels XWalk ermittelte Abstände zwischen möglichen Reaktionspartnern für EDC	54
Tabelle 14: Gefundene mittels EDC vernetzte Peptide	65

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzipieller Aufbau eines Crosslinking Experiments	18
Abbildung 2: Prinzipieller Aufbau eines HRP-Experiments	21
Abbildung 3: Strukturformeln der Reaktionen Aminosäure-Seitenketten beim Kontakt mit der Bremsstrahlung beschleunigter Elektronen	26
Abbildung 4: Emissionsverlust von Alexa 488 durch Bestrahlung im linear Beschleuniger	41
Abbildung 5: Emissionsverlust mit Unterschiedlichen Proteinkonzentrationen und Protein/ Proteinkomplex	42
Abbildung 6: Vergleich Begasung über Ionenstromstärke	43
Abbildung 7: Vergleich bestrahlter Proben Alexa 488 + 5mM Betalactoglobulin unterschiedlicher Begasung	43
Abbildung 8: Sequenzabdeckung bei unbestrahltem Betalactoglobulin	45
Abbildung 9: Peptid-Intensität in Abhängigkeit von Dosis und Sequenzposition	46
Abbildung 10: Intensität unmodifizierter Peptide, identifiziert und quantifiziert mittels MaxQuant.	47-48
Abbildung 11: Verhältnis der Peakfläche modifizierter Spezies gegen die Gesamt-Peakfläche des Peptides, aufgetragen gegen den log ₂ der Verringerung der Intensität von Alexa 488.	49-50
Abbildung 12: MS/MS-Spektrum des Peptides ALKALMPHIR mit Massenshift am Methionin145	50
Abbildung 13: Beispiel MS/MS-Spektrum mit möglichem Crosslink zwischen den Peptiden -IDALNENK- und -IIAEKTK- an den Positionen K91 und E74.	54
Abbildung 14: In der Struktur von 1BSY eingeschlossenes Wassermolekül nahe Methionin 24	62
Abbildung 15: Sequenzabdeckung, Dynamiken der Peptide und identifizierte Modifikationsstellen in der Sequenz von Betalactoglobulin	62
Abbildung 16: Sequenzabdeckung, Dynamiken der Peptide und identifizierte Modifikationsstellen in der Struktur von Betalactoglobulin	63
Abbildung 17: Sequenzalignment von 1BSY und 1CJ5	64
Abbildung 18: Gefundene mittels EDC vernetzte Peptide	65

Abkürzungsverzeichnis

DNS	Desoxyribonukleinsäure
ESI	Elektrospray Ionisation
ETD	Elektronen Transfer Dissoziation
FDR	False Detection Rate
HDX	Hydrogen-Deuterium Austausch (Exchange)
HPLC	High Pressure Liquid Chromatographie
HRPF	Hydroxylradical Proteinfootprinting
LC	Liquid Chromatographie
MS	Massenspektrometrie/ Massenspektrometer
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NMR	Nuklear Magnetresonanz Spektroskopie
NOE	Nuclear Overhauser Effekt
RP	Radical Probing
SAS	Solvent Accessible Surface
SASA	Solvent Accessible Surface Area

1 Einleitung

1.1 Proteinstrukturaufklärung

Proteine sind die Hauptakteure aller essentiellen biologischen Prozesse. Angepasst an die unterschiedlichen Funktionen, welche enzymatische Aktivität, strukturelle Stabilität, Stofftransport, Energiegewinnung, gezielte Bindung und Abbau von Schadstoffen und die Interaktion, den Aufbau sowie Abbau anderer Biomoleküle umfassen, weisen sie eine enorme chemische und physikalische Diversität auf. Von besonderer Bedeutung für die korrekte Funktionalität ist dabei die dreidimensionale Proteinstruktur. Im Gegensatz dazu können Proteinfehlfaltung zu ernsthaften Störungen, wie beispielsweise der Alzheimerschen Krankheit führen.

Im Umkehrschluss stellt die Aufklärung einen fundamentalen Schritt zu einem molekularen Verständnis der Funktion, Regulation und Arbeitsweise eines Proteins dar. Des Weiteren ist die Struktur eines Proteins und die damit verbundene Identifizierung von Bindungsstellen und katalytischen Zentren die Grundlage für eine zielgerichtete Entwicklung von Pharmaka.

Die Strukturaufklärung aller humanen Proteine sowie deren Anordnungen in Proteinkomplexen stellt daher eine der zentralen biologischen Fragestellungen der nächsten Jahre bzw. Jahrzehnte dar.

In der Protein Database (PDB) sind aktuell (Stand August 2012) die Strukturen von 77.740 Proteinen hinterlegt. Trotz konkurrierender Methoden wie der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) und der Kryo-Elektronenmikroskopie stellt die Röntgen-Kristallstrukturanalyse (RKG) heute (Stand 2012) rund 85 % der annotierten Strukturen. Bei dieser Methode werden idealerweise Einkristalle des zu untersuchenden Proteins durch die langsame Übersättigung einer Fällungslösung mit dem jeweiligen Protein erzeugt.

Durch die physikalischen Gegebenheiten innerhalb eines Kristalls wird die räumliche Bewegung der Seitenkette und der nicht durch Wasserstoffbrückenbindungen oder Disulfidbrücken stabilisierten Strukturelemente eingeschränkt. Die Ergebnisse der RKG sind als Momentaufnahmen dynamischer Strukturen zu verstehen und liefern trotz Angabe der b-Werte nicht immer zuverlässige Aussagen über die Beschaffenheit wichtiger dynamischer Interaktionsflächen. Oft bilden sich Bindungen aus, die im nativen Zustand nicht existieren (Crystal Packing) [1]. Die Methode benötigt außerdem eine sehr große Menge des zu untersuchenden Proteins, welches oft nicht in der erforderlichen Konzentration zur Verfügung steht. Die Proteinkristallisation ist ein komplexer Prozess und die Experimente erfordern das exakte Ermitteln der geeigneten Kristallisationsbedingungen über viele Monate hinweg, die Kristalllösung selbst muss oft über einige Wochen im metastabilen Zustand gehalten werden um einen geeigneten Kristall ohne Strukturfehler zu erhalten. Die Experimente sind im Allgemeinen sehr langwierig [2, 3].

NMR-Strukturen zeigen Proteine zwar Strukturen in ihrer physiologischen Umgebung und Konformation doch sind die analysierbaren Proteine durch ihre Masse beschränkt. Die größte mittels NMR ermittelte Struktur hatte eine Dimension von 100 kDa, 20-mal kleiner als die mittel RKG ermittelte Struktur des Ribosoms. Die meisten NMR-Strukturen bewegen sich in einem Bereich um 25 kDa. Ein weiteres Problem stellen die enormen Mengen an Probe dar die für erfolgreiche NMR Aufklärung benötigt werden. Selbst durch neuste Methoden liegt dieser noch bei 30-200 µg. Ebenfalls limitieren die verwendbaren Puffer und Salze die Anzahl an aufklärbaren Proteinstrukturen [4, 5, 6, 7].

Kryo-Elektronenmikroskopie bzw. Elektronen-Kristallographie ist eine noch junge Technik die nur von wenigen Arbeitsgruppen abgewandt wird, ihr zukünftiger Erfolg ist schwer abzuschätzen und die bisher erzielte Auflösung liegt weit hinter NMR und RKG erzeugten Strukturen [2, 8, 9].

Trotz enormer Fortschritte in Bezug auf die Geschwindigkeit sowie die Anwendbarkeit der NMR und RKG stehen mit 954 Strukturen erst von weniger als 5%

aller humaner Proteine zumindest teilweise Strukturinformationen zur Verfügung. Diese Daten fallen in Bezug auf gelöst Proteinkomplexe nochmals deutlich geringer aus. Durch moderne Hochdurchsatzverfahren hat die Geschwindigkeit der Sequenzannotation die der Strukturauflösung längst überholt. Betrachtet man dieses Verhältnis wird die Notwendigkeit für eine Methode welche in der Lage ist diese Lücke zu schließen schnell klar.

Die Bioinformatik stellt zu diesem Problem eine Reihe von Algorithmen zur Verfügung, die in der Lage sind aus der Kenntnis der Aminosäuresequenz und einiger statistisch relevanter Erhebungen zu Strukturmerkmalen in Proteinen 3D Strukturen zu postulieren. Mittlerweile stehen zu etwa 66% aller humanen Proteine modellierte Strukturen in der Modbase bereit [10]. Oftmals ist die Variabilität an physikalisch und statistisch möglichen Modellen jedoch sehr hoch. Um aussagekräftige Modelle zu entwickeln, ist es nötig die Menge an erzeugten Modellen zu minimieren und den Bereich der möglichen Modelle mit experimentellen Daten einzuschränken bzw. erhaltene Modelle zu validieren [11, 12].

Um die existierende Diskrepanz zwischen der Anzahl aufgeklärten Proteinstrukturen und bekannten Proteinen sowie Proteinkomplexen zu schließen, besteht hoher Bedarf an Methoden, die eine schnelle Verfeinerung und Validierung von Strukturmodellen erlauben und dabei auf unterschiedliche Proteinklassen anwendbar sind.

Massenspektrometrie basierte Methoden zur Strukturaufklärung stellen dabei eine Reihe vielversprechende Methoden zur Verfügung, welche einen weitaus geringeren Zeitbedarf und Materialaufwand als die etablierten Methoden benötigen. Methoden, wie z.B. Chemisches Crosslinking, Wasserstoff-Deuterium Austausch (HDX) oder das Hydroxyl-Radikal Footprinting (HRFP) ermöglichen es in Kombination mit hochsensitiver Massenspektrometrie in Form von Oberflächenzugänglichkeiten, Strukturdistanzen sowie der Aufklärung von Sekundärstrukturelementen verwertbare Information über Proteinstrukturen zu erhalten.

Allen drei aufgezählten Methoden ist gemein, dass die zu untersuchenden Proteine bzw. Proteinkomplexe zunächst unter weitestgehend physiologischen Bedingungen – in Bezug auf Salzgehalt, Pufferkonzentration, pH-Wert – kovalent modifiziert werden, um die Strukturinformation für die nachfolgende Analyse zu fixieren. In einem nachfolgenden Schritt werden die Proteine in Peptide gespalten und die im ersten Schritt induzierte Massenveränderung an dadurch modifizierten Aminosäuren massenspektrometrisch bestimmt.

HRFP stellt eine der vielversprechendsten Methode dar. Bei dieser Methode werden die Proteinlösung bestrahlt, wodurch durch Radiolyse Hydroxylradikale gebildet werden. Die dem Lösungsmittel zugänglichen Seitenketten werden in einer Reaktion mit den gebildeten hochreaktiven Hydroxyl-Radikalen innerhalb von Mikrosekunden modifiziert. Dabei handelt es sich im Gegensatz zum HD-Austausch beim RHFP um eine irreversible Modifizierung. Für 15 der 20 proteinogenen Aminosäuren wurde von Chance et al. 11 gebräuchliche Modifikationen beschrieben [13].

Die Methode hat viele Vorteile besonders bei der Charakterisierung von Bindungsflächen. Allerdings ist auch eine Anzahl an exzellenten Geräten für erfolgreiche Experimente notwendig. Für die Radiolyse von Wasser ist ein Elektronenbeschleuniger notwendig und die Aufklärung der modifizierten Oberfläche verlangt nach einer Hochauflösenden Massenspektrometrie Methode. Durch die Kooperation des Helmholtz-Zentrums für Umweltforschung mit dem Leipziger Institut für Oberflächenmodifikation kommen an diesem Wissenschaftsstandort die wichtigsten Bedingungen zusammen. Da die experimentellen Bedingungen nur schwer mit denen anderer Arbeitsgruppen vergleichbar sind - Elektronenbeschleuniger sind zumeist hochspezielle Sonderanfertigungen die kaum Anwendung in den Life-Sciences finden bedarf der Versuchsaufbau einer sorgfältigen Validierung. Die Methode gilt grundsätzlich als entwickelt, dennoch gibt es ein breites Spektrum an angewendeten Versuchsanordnungen und Vorgehensweisen.

1.2 Zielstellung

Die Methode des Hydroxylradikal Protein Footprintings sollte im Rahmen dieser Masterarbeit am Helmholtzzentrum für Umweltforschung – UFZ etabliert und für die Untersuchung des Modellproteins Betalactoglobulin angewandt werden.

Die erhaltenen Resultate sollen mit den Ergebnissen der Publikation „Pulsed Electron Beam Water Radiolysis for Sub-Microsecond Hydroxyl Radical Protein Footprinting“, in der die renommierten Arbeitsgruppe Sharp et al. Betalactoglobulin untersuchte, verglichen werden.

2 Hintergrund

2.1 Massenspektrometrie

Als Massenspektrometer (MS) werden Geräte bezeichnet, welche die Massen von Molekülen und Atomen nach einer Ionisation über eine Trennung nach dem Masse-Ladungs-Verhältnis bestimmen. Ein Massenspektrometer besteht nur aus wenigen prinzipiellen Bauteilen, - einem Einlasssystem, einer Ionenquelle, dem Massenanalysator und dem Detektor. Als Einlasssystem sind Gaschromatographen und Flüssigkeitschromatographen gebräuchlich, direkte Einspeisung des Analyten ist allerdings ebenfalls möglich. Die Ionenquelle ionisiert die Analyten, welche danach in einem elektrischen Feld beschleunigt und dem Analysator zugeführt werden. Dieser ermöglicht die Bestimmung des Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) der Ionen. Der Detektor registriert die Intensitäten der getrennten Ionen. Ab dem Einlasssystem sind alle Teile des Messaufbaus von der Umgebung-Atmosphäre getrennt. Der Analyt befindet sich während der Messung im Hochvakuum, um durch Zusammenstöße mit Luftmolekülen induzierte Fragmentierung oder Ablenkung der Ionen zu vermeiden [14,15].

2.1.1 MS/MS bzw. Tandem-Massenspektrometrie

Als Tandem-Massenspektrometrie bezeichnet man die Analyse von Fragment- oder auch Tochterionen, welche durch die Fragmentierung von Vorläuferionen- oder Mutterionen in der Gasphase erzeugt wurden. Durch die Zuführung einer hinreichenden Energie zerfallen Mutterionen dabei in bestimmte kleinere Ionen. Am gebräuchlichsten sind sogenannte Triple-Quadrupol Geräte. Bei dieser Konfiguration wird meist durch Elektronen-Spray-Ionisation ein Quasi-Molekül-Ion erzeugt und im ersten Quadrupol durch das entsprechende elektrische Feld isoliert, um dann im zweiten Quadrupol (der Kollisionszelle) angeregt zu werden. Der Druck im inneren des zweiten Quadrupols entspricht einem Wert bei welchem im Mittel jedes Ion nur einmal mit einem Gasmolekül kollidieren sollte. Die Vorläuferionen zerfallen durch die Anregung in spezifische kleinere Ionen.

Im dritten Quadrupol werden alle oder nur ein bestimmtes Fragmentation des im ersten Quadrupol erzeugten Molekülions analysiert. Durch die Beobachtung aller Fragmentationen sind Rückschlüsse auf die Struktur des Analyten möglich. Werden nur wenige Fragmentationen beobachtet sind sehr genaue Quantifizierungen möglich. Alternative Möglichkeiten, um eine Fragmentierung zu initialisieren sind die Anregung durch LASER im UV-Bereich, Elektronenkanonen (Electron Capture Dissociation) oder Electron Transfer Dissociation (ETD), welche gerade für die Proteinidentifikation vorteilhaft ist [16].

2.1.2 Orbitrap Massenspektrometer

In einem Orbitrap Massenanalysator werden die erzeugten Ionen in einer Tangentialbahn in das elektrische Feld zwischen den Elektroden gebracht, aufgrund der Gegenwirkung der Zentrifugalkraft und der elektrostatischen Anziehung zur inneren Elektrode werden sie vergleichbar zu einer Ionenfalle gefangen. Die Ionen befinden sich in einer cyclischen Bewegung um die zentrale Elektrode und einer axialen Bewegung zur Elektrode. Die Trajektorie der Ionen oszilliert damit entsprechend ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses. Diese Oszillation ist umgekehrt proportional zur Quadratwurzel des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses. Durch Fourier Transformation erhält man aus den Signalen ein Massenspektrum. Thermo Fisher Scientific vermarktet ein Gerät mit einer lineare Ionenfalle vor der Orbitrap als LTQ Orbitrap [17].

2.2 MS-basierte Proteinstrukturaufklärung

2.2.1 Chemisches Crosslinking

Strukturinformationen geringer Auflösung lassen sich durch Crosslinking Experimente mit anschließender Analyse im Massenspektrometer erhalten. Beim Crosslinking werden reaktive Aminosäuren an der Oberfläche des Proteins kovalent mit einander verknüpft. Nach dem anschließenden Verdau mittels einer Peptidase werden die Peptide, welche vernetzt sind identifiziert. Proteine in ihrer Quartärstruktur interagieren spezifisch mit ihren Bindungspartnern. Um die Interaktion monomerer Untereinheiten zu größeren Strukturen zu untersuchen eignet sich Chemisches Crosslinking besonders gut. In solchen Experimenten wird die räumliche Beziehung der Monomere in der Quartärstruktur durch die Vernetzung ermittelt. Abbildung 1 zeigt den prinzipiellen Aufbau beider Crosslinking-Experimente. Die vergleichsweise geringe Anzahl an inter-Peptid Crosslinkern, das Filtern informationsloser Abstände (immer zutreffen Abstände) und die typischerweise komplizierte Fragmentierung vernetzter Peptide in der Tandem MS sind die größten Herausforderungen bei Crosslinking Experimenten.

Prinzipieller Aufbau eines Crosslinking Experiments

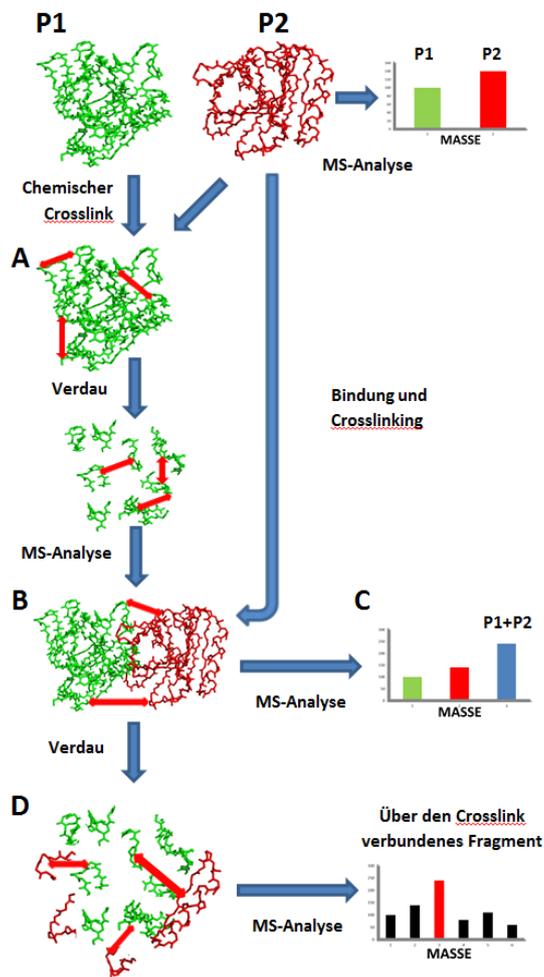


Abbildung 1: Zwei Proteine individueller Massen werden Analysiert. Im Protein P1 werden Crosslinks intramolekular eingesetzt. Das Protein wird durch ein Enzymgespalten und die kovalent verbundenen Peptide identifiziert (A), sie haben die kombinierte Masse der Peptide addiert zur Crosslinker-Masse (Ausnahmen sind hier Zero-Length Crosslinker) minus der Masse der abgespaltenen Edukte (z.B. Wasser bei der Bindung an eine Carboxylgruppen vergleichbar mit der Peptidbindung). (B) Proteinkomplexe können ebenfalls mittels Crosslinks verknüpft werden. Die Analyse kann nach dem Verdau (D) oder direkt erfolgen (C). Sind die Peptide kovalent über den Crosslink gebunden ergibt sich ihr Peak im Spektrum wieder aus der Summe der Molekülmassen (D). Im Vergleich zu Spektren nicht behandelte Peptide existiert ein neuer Peak der der Summe der Peptide entspricht (D). Aus der Position des Crosslink's und der Abstandsinformation kann die Bindungsfläche der Monomere postuliert werden. Die Abstandsinformationen werden genutzt um die große Anzahl an möglichen Modellen welche beim Homologie Modeling entstehen zu validieren und zu filtern.

2.2.2 Bedingungen für Chemisches Crosslinking

Viele Crosslinker greifen polare Gruppen wie freie Carboxylgruppen oder primäre Amine an. Diese befinden sich oft zugänglich an der Moleküloberfläche und kommen häufig genug vor um experimentelle Erfolge zu erzielen. Die Anzahl an möglichen Crosslinks erreicht zum Teil so hohe Werte dass die Gesamtheit aller erreichbaren Seitenketten eine Vielfachheit erreicht die den Struktur-Informationsgehalt der Experimente beschneidet. Besonders lange Spacer führen oft auch zur Bildung mehrfach vernetzter Peptide welche in der Massenspektrometrie nur schwer detektiert und interpretiert werden können. Durch die Änderung der experimentellen Parameter sollten optimale Bedingungen zur Informationsgenerierung gefunden werden. Dabei muss beachtet werden dass sich

die Bedingungen unter denen das Experiment abläuft noch in den Grenzen der natürlichen, physiologischen Zustände befinden und die native Proteinstruktur nicht zu stark beeinflusst wird. Der Effekt der Crosslinker Substanz auf Struktur und Funktion von Proteinen wird dabei gern überschätzt. Einige Publikationen wie Govardhan et al. [18] zeigen dass eine große Anzahl von Vernetzten Enzymen ihre Funktion und Aktivität behalten. Dabei erreichten Studien zu Molekülen zu denen bereits Röntgen-Kristall-Strukturen aufgelöst waren sehr gute Näherungen bis Übereinstimmungen mit den Abständen im Kristall [19, 20].

2.2.3 Auswertung der Experimente

Durch Informationen über die Länge des Crosslinker's und die Masse identifizierter verknüpfter Peptide lassen sich zum Beispiel Modelle des Proteins welche durch Homologie Modeling erzeugt wurden validieren. Durch Algorithmen ähnlich denen bei NMR NOE (Nuclear Overhauser Effect) können so Strukturen geringer Auflösung erzeugt werden. Dabei wird Länge des Crosslinker Spacers zum Radius einer Kugel die den maximalen Abstand zwischen den vernetzten Seitenketten beschreibt. NOE ist dabei in der Lage schon bei kleinen Proteinen hunderte solcher Kugeln zu beschreiben, deren Anzahl ist bei Crosslinking Experimenten weitaus beschränkter. Die Daten werden genutzt um eine Auswahl von Modellen zu minimieren und die Konformationen zu ermitteln welche am häufigsten bzw. wahrscheinlichsten eingenommen werden. Um Strukturen zu gewinnen werden bei einem n Aminosäuren langem Peptid durchschnittlich $3 \cdot n$ Abstände benötigt. Die geschätzte Anzahl an Crosslinks um den Fold bzw. die Faltung eines Proteins zu erfassen wurde auf $n/10$ geschätzt [21]. Die Anzahl an validen Distanzinformationen die durch ein Crosslinking Experiment erreicht werden können liegt ungefähr in diesem Bereich. Ein komplettes Molekül daraus zu modellieren ist aufgrund des Datenmangels nicht möglich, allerdings lässt sich der Fold bestimmen und Sets von Homologie-Modeling-Strukturen filtern.

2.3 Hydroxyl-Radikal Proteinfootprinting

Das Hydroxyl-Radikal Proteinfootprinting (kurz HRPf oder Radikal Probing bzw. RP) hat sich als State of the Art Methode bei der Analyse von Protein-DNS, Protein-Ligand und Protein-Protein Interaktionsflächen erwiesen. Mit dieser Methode erzeugte Hydroxyl-label sind unspezifisch, kovalent, und greifen eine breite Menge für Wasser zugängliche Seitenketten der Proteinoberfläche an. Beim RHPf werden Proteine in wässriger Lösung ionisierenden Strahlenquellen wie Röntgenröhren, Isotopen im γ -Zerfall, hoch energetischen Lasern oder Elektronen-beschleunigern (Bremsstrahlung der emittierten Elektronen) ausgesetzt. Die Energie der erzeugten Strahlung ist in der Lage Elektronen aus den Elektronenhüllen der Atome zu lösen und führt somit zur Entstehung von positiven Molekülionen. Das Molekülion des Wassers, H_2O^+ , zerfällt dabei in H^+ und ein OH-Radikal. Diese sind selbst hochreaktive Spezies und erzeugen in Querreaktionen z.B. Superoxide (HO_2) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Speziell bei Wasser nennt man diesen Prozess Radiolyse. Die Hydroxylradikale im Lösungsmittel sind in der Lage mit den Atomen der zugänglichen Seitenketten zu reagieren. Dies geschieht schneller als Faltungsprozesse ablaufen können und die räumliche Struktur des Proteins wird nicht gestört. Der Grundlegende Aufbau eines HRPf Experiments ist in Abbildung 2 dargestellt. Nach einer enzymatischen Proteolyse lassen sich die Stellen der Oxidation mit Hilfe der Massenspektrometrie und geeigneter Suchalgorithmen bis auf eine Aminosäure genau bestimmen. Nutzt man die Methode zum Vergleich zweier räumlicher Zustände eines Proteins ergibt sich - durch eine Liganden induzierte Konformationsänderung, das Besetzen einer Bindungstasche oder die Bildung eines Proteinkomplexes, eine Abschirmung der Seitenketten die im Vergleichszustand für das Lösungsmittel noch zugänglichen waren. Durch diese Überlegung lassen sich die Seitenketten welche an den untersuchten Prozessen teilhaben in sehr guter Näherung bestimmen. Durch verschiedene Proben mit z.B. unterschiedlichen pH-Werten lassen sich so auch Entfaltungprozesse beobachten.

Prinzipieller Aufbau eines HRPF-Experiments

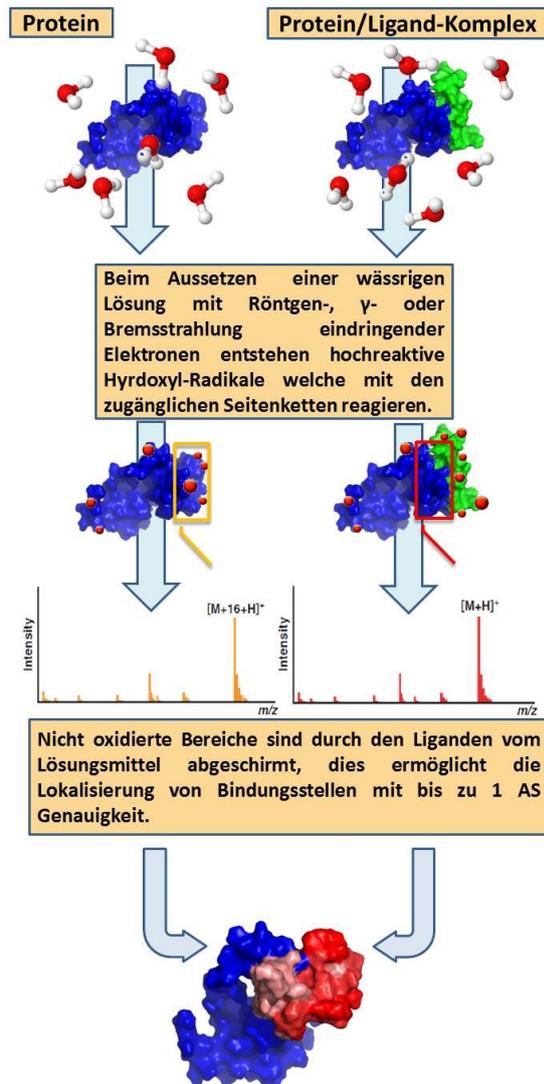
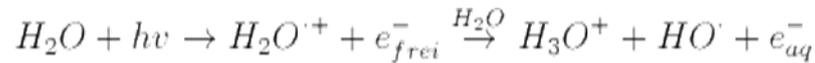


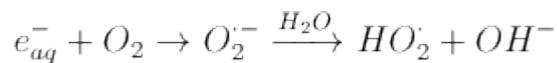
Abbildung 2: Ablauf eines HRPF-Experiments

2.3.1 Chemie des Hydroxyl Radikal Protein Footprinting

Die Radiolyse des Wasser ist ein chemisch komplexer Vorgang und schon seit langem ein aktives Forschungsgebiet in der Strahlen Chemie Hydroxylradikal werden bei der Radiolyse von Wasser nach folgenden Gleichungen erzeugt.



Unter aeroben Bedingungen entstehen Hyperoxid-Anionen und Hydroperoxid Radikale.



Im Probenvolumen wird dabei ein sogenannter Spur (engl. Für Sporn) erzeugt, dies ist der Anteil des Probenvolumens der direkt in Kontakt mit der Bremsstrahlung der Elektronen kommt bzw. dieser in dem der zugeführte Energieanteil noch hoch genug ist um eine Radiolyse zu erzeugen. In diesem Bereich finden die Zerfallsreaktionen des Lösungsmittels statt. Die Spurs expandieren im Volumen durch Diffusion. Viele der erzeugten Produkte reagieren schnell wieder miteinander ab, ein kleinerer Anteil verteilt sich schnell im gesamten Probenvolumen. Es wird davon ausgegangen dass die Lebensdauer eines Radikal welches im Lösungsmittel mit einem Reaktant abreagieren soll bei 10^{-7} s^{-1} liegt, dabei hat der Reaktant eine Konzentration von 10^{-3} mol/L [22]. Alle auftretenden Reaktionen sind in Tabelle 1 aufgezeigt. Der große Vorteil der Radiolyse als Methode zur Erzeugung reaktiver Radikale liegt darin dass die Menge an Energie welche von allen anderen Komponenten des Systems aufgenommen wird proportional zu ihrem Elektronenanteil ist. Dies bedeutet dass in einer gebräuchlichen Verdünnung von weniger als $0,1 \text{ mol/L}$ mit Wasser als Lösungsmittel alle Energie von diesem aufgenommen wird. Somit sind die Erträge der primären Produkte bekannt. Die Hydroxylradikale reagieren sofort mit den zugänglichen Seitenketten des Proteins, Verluste werden durch Radikalfänger wie Puffer oder andere Komponenten erzeugt. Tabelle 2 zeigt die Reaktionsraten ($\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$) der reaktiven Aminosäuren mit Hydroxyl-Radikalen. Der genaue Mechanismus hängt stark von der chemischen Struktur der Seitenkette ab. Der gebräuchliche Mechanismus basiert auf der Reaktion von Hydroxyl- oder Oxo-Gruppen mit den

Seitenketten welche in einem Massenshift von +16 (und +14) Da resultieren. Einige andere Aminosäuren reagieren mit anderen Massenshifts (Tabelle 2). Die Reaktionen von basischen Aminosäuren sind am vielfältigsten. Histidine wurden mit vier verschiedenen Massenshifts von -23 bis +16 Da beobachtet. Arginine können am β - oder γ -Kohlenstoff von ihren Wasserstoff Liganden getrennt werden (+16; +14), sollte das δ -Kohlenstoffatom angegriffen werden resultiert dies in der Elimination der Guanidingruppe (-43 Da).

**Reaktionen von Wasser beim Kontakt mit der Bremsstrahlung
beschleunigter Elektronen**

$e_{\text{aq}}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^\cdot + \text{OH}^-$	1.9×10^1
$e_{\text{aq}}^- + e_{\text{aq}}^- \rightarrow \text{H}_2 + 2 \text{OH}^-$	$2k = 1.1 \times 10^{10} \text{ a}$
$e_{\text{aq}}^- + \text{H}^\cdot \rightarrow \text{H}_2 + \text{OH}^-$	2.5×10^{10}
$e_{\text{aq}}^- + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{OH}^-$	3.0×10^{10}
$e_{\text{aq}}^- + \cdot\text{O}^- \rightarrow 2 \text{OH}^-$	2.2×10^{10}
$e_{\text{aq}}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}^\cdot$	$2.3 \times 10^{10} \text{ a}$
$e_{\text{aq}}^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$	1.1×10^{10}
$e_{\text{aq}}^- + \text{HO}_2^- \rightarrow 2 \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$	3.5×10^9
$e_{\text{aq}}^- + \text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^{\cdot-}$	$1.9 \times 10^{10} \text{ a}$
$e_{\text{aq}}^- + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{O}_2^{2-}$	1.3×10^{10}
$\text{H}^\cdot + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2 + \cdot\text{OH}$	1×10^1
$\text{H}^\cdot + \text{H}^\cdot \rightarrow \text{H}_2$	$2k = 1.55 \times 10^{10} \text{ a}$
$\text{H}^\cdot + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	7.0×10^9
$\text{H}^\cdot + \text{OH}^- \rightarrow e_{\text{aq}}^-$	$2.2 \times 10^7 \text{ a}$
$\text{H}^\cdot + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$	9×10^7
$\text{H}^\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{HO}_2^\cdot$	$2.1 \times 10^{10} \text{ a}$
$\text{H}^\cdot + \text{HO}_2^\cdot \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	$\sim 10^{10}$
$\cdot\text{OH} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	$2k = 1.1 \times 10^{10} \text{ a}$
$\cdot\text{OH} + \cdot\text{O}^- \rightarrow \text{HO}_2^-$	$\leq 2 \times 10^{10}$
$\cdot\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{H}^\cdot + \text{H}_2\text{O}$	4.2×10^7
$\cdot\text{OH} + \text{OH}^- \rightarrow \cdot\text{O}^- + \text{H}_2\text{O}$	1.3×10^{10}
$\cdot\text{OH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{HO}_2^\cdot$	
$\rightleftharpoons \text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+$	2.7×10^7
$\cdot\text{OH} + \text{HO}_2^- \rightarrow \text{OH}^- + \text{HO}_2^\cdot$	
$\rightleftharpoons \text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+$	7.5×10^9
$\cdot\text{OH} + \text{H}_2\text{O}_2^+ \rightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{O}_2$	1.2×10^{10}
$\cdot\text{OH} + \text{HO}_2^\cdot \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	6×10^9
$\cdot\text{OH} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{OH}^- + \text{O}_2$	8×10^9
$\cdot\text{O}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$	1.8×10^6
$\cdot\text{O}^- + \cdot\text{O}^- \rightarrow \text{O}_2^{2-}$	^b
$\cdot\text{O}^- + \text{H}_2 \rightarrow \text{H}^\cdot + \text{OH}^-$	8.0×10^7
$\cdot\text{O}^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}$	$\leq 5 \times 10^8$
$\cdot\text{O}^- + \text{HO}_2^- \rightarrow \text{O}_2^{\cdot-} + \text{OH}^-$	4×10^8
$\cdot\text{O}^- + \text{O}_2 \rightarrow \text{O}_3^-$	$3.6 \times 10^9 \text{ a}$
$\cdot\text{O}^- + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow 2 \text{OH}^- + \text{O}_2$	6.0×10^8

Tabelle 1: Reaktionen und Rückreaktionen bei der Radiolyse von Wasser mit den jeweiligen Reaktionsrate k , nach Buxton et. al.

a ausgewählter Wert

b nicht verlässlicher Messwert

Massenshift's, chemische Modifikation und Reaktionsgeschwindigkeit der in der Literatur erschienenen, detektierten Aminosäuren welche mit Hydroxylradikalen reagieren

Aminosäure	k (M ⁻¹ sec ⁻¹)	Chemische Änderung	Massen- Shift (Da)
Cysteine	3,4*10 ¹⁰	+2O	+31,9898
		+O-S	-15,9772
Histidine	1,3*10 ¹⁰	+3O	+47,9847
		+O	+15.9949
		+O-2C-N-H	-23.0160
		+2O-2C-2N-2H	-22,0320
Tryptophan	1,3*10 ¹⁰	+2O-C-2N-2H	-10,0320;
		+O	+15.9949
Tyrosine	1.3*10 ¹⁰	+2O	+31,9898
		+O	+15.9949
Proline	1,2*10 ¹⁰	+2O	+31,9898
		+O	+15.9949
Methionine	8,3*10 ⁹	+O-2H;	+13,9793
		+O	+15.9949
Valine	7,6*10 ⁸	+2O	+31,9898
		+O-S-C-4H	-31,9898
		+O	+15.9949
Phenylal- anine	6,5*10 ⁹	+O-2H;	+13,9793
		+O	+15.9949
Arginine	3.5*10 ⁹	+2O	+31,9898
		+O	+15.9949
Leucine	1,7*10 ⁹	+O-2H	+13,9793
		+O-3NC-5H	-43,0534
		+O	+15.9949
Aspargin Säure	7,5*10 ⁸	+O-2H;	+13,9793
		-C-2H-O	-30.0106
Threonine	5,1*10 ⁸	+O	+15.9949
Lysine	3,5*10 ⁷	+O	+15.9949
		+O-2H;	+13,9793

Tabelle 2: Reaktionskonstanten reaktiver Aminosäuren [23] und Massenshifts [24]

Der Verlust einer starken positiven Ladung kann zu Problemen beim tryptischen Verdau führen und die Identifizierung von Arginin haltigen Peptiden bei der Massenspektrometrie mit positiven Ionen erschweren. Schwefelhaltige Aminosäuren wie Cysteine oder Methionine reagieren, wenn zugänglich, schnell ab. Methionine reagieren zu Sulfoxiden (+16 Da) und weniger effizient zu doppelten Oxiden. Cystein wird vorrangig zu negativ geladener Cysteinsäure umgewandelt, welche wiederum schwer zu detektieren ist sollte mit positiven Ionen gearbeitet werden. Lysin reagiert nach demselben Mechanismus wie aliphati-

sche Seitenketten. Die Reaktion aliphatischer Seitenketten startet mit einem nukleophilen Angriff auf die Wasserstoffatome. Unter aeroben Bedingungen kann das entstandene Kohlenstoff Radikal mit Sauerstoff reagieren und über ein Zwischenprodukt als Peroxid Radikal eine Hydroxyl- oder Keto-Gruppe bilden (Mass-Shift 16 oder 14 Da). Reagieren Hydroxyl-Radikale mit sauren Gruppen kommt es zum Verlust von CO_2 der zur Bildung eines Aldehyds und einem Masseverlust von 30 Da führt [25]. Bei aromatischen Aminosäuren kommt es zu einer Addition der Hydroxylgruppe an den Ring, dies führt zu einem Massen-Shift von +16 Da oder einem Vielfachen davon. Diese Reaktionen zeigen eine Kinetik von 10^7 – $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ [21], es wird allerdings angenommen dass für erfolgreiche Experimente eine Reaktionsraten-Konstanten von über $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ nötig sind. Abbildung 3 von Chance et al. [26] zeigt die ablaufenden Reaktionen. Weniger Reaktive Aminosäuren und solche deren Produkte schwer zu identifizieren sind, wie Serin und Threonin, tragen oft wenig zu Informationsmenge für die Strukturanalyse bei. 14 der 20 Aminosäuren tragen allerdings bereits zu ca. 65% der Sequenz eines typischen Proteins bei, was zu einer hinreichend Auflösung der Experimente führt.

Strukturformeln der Reaktionen Aminosäure-Seitenketten beim Kontakt mit der Bremsstrahlung beschleunigter Elektronen

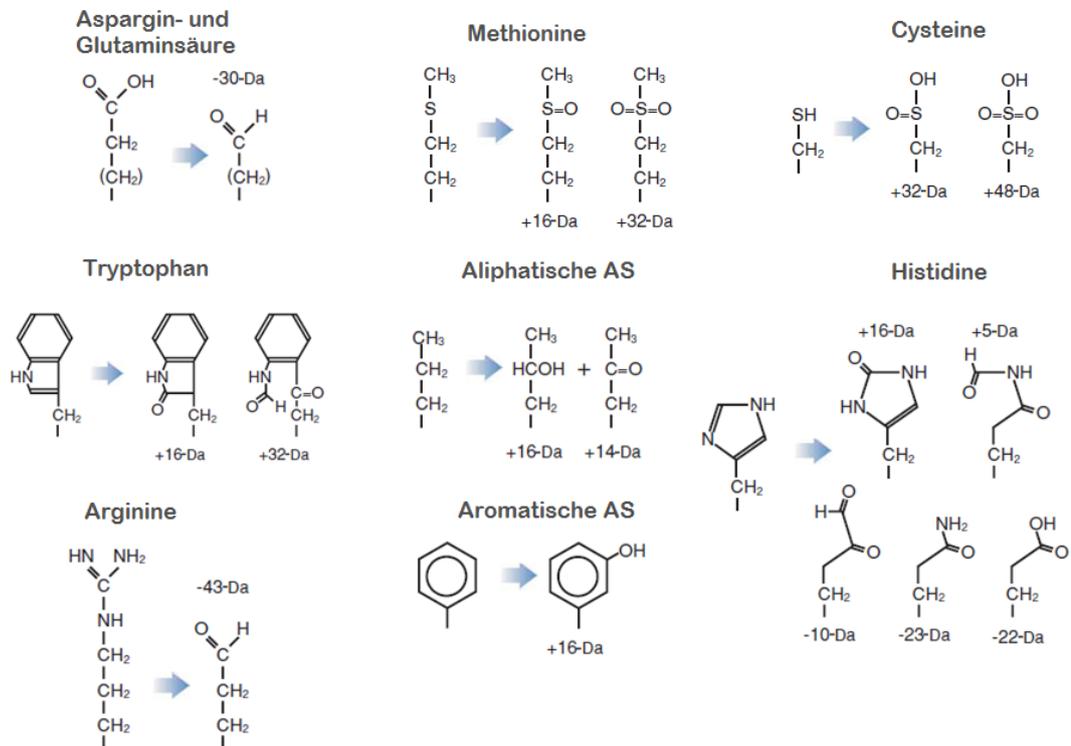


Abbildung 3: Reaktionen beim RP nach Chance et al. 2006.

2.3.2 Aufbau und Auswertung eines RP-Experiments

Der Prinzipielle Aufbau des Experiments wurde bereits in Abbildung 2 erläutert, im Folgenden werden Ansätze zur Auswertung der gewonnenen Daten vorgestellt. In einem RP Experiment werden oft mehrere Bestrahlungs-Intensitäten gewählt um das mit der Bestrahlungs-Stärke korrelierende Auftreten verschiedener Modifikationen zu beobachten. Bestrahlungs-Intensitäten steht hier für einen Mischbegriff aus Energie-Dosis und Bestrahl-Zeit. Die von vielen Arbeitsgruppen eingesetzten Synchrotron Teilchen-Beschleuniger nutzen eine Blende (Shutter) um die Bestrahlungs-Zeit mit dem so genannten „White Beam“ direkt zu regulieren. Bei Linear Beschleunigern wird die Stärke der Bestrahlung oft durch den Kathodenstrom und die Einstellung der typischerweise kürzeren Bestrahlungs-Zeiten (maximal ms) eingestellt. Die Dosis ergibt sich aus der Fläche die die

Kurve aus Pulslänge (Bestrahlungs-Zeit) und Pulshöhe (Kathodenstrom) einschließt direkt proportional, obwohl die Diffusität des Elektronenstrahls bei einigen Geräten zwischen kleinen Änderungen der Einstellungen zum Teil variiert. Die Dosis entspricht damit der Energiedosis welche als Quotient von Energie und Masse die Menge an Energie beschreibt die eine Quantität aufgenommen hat. Nach dem Verdau und der Aufzeichnung der MS/MS-Spektren werden die integrierten Peak Flächen der identifizierten Peptide quantifiziert. Ein Ansatz stellt die Betrachtung der Inkrementierung unmodifizierter Peptidspezies über verschiedene Bestrahlungsintensitäten dar. Es ergeben sich typische Kurven mit sinkenden Intensitäten für Peptide die in der Struktur an der Protein-Oberfläche liegen und reaktiv sind. Ein weiterer Ansatz ist die direkte Beobachtung modifizierter Peptide und deren Verhalten in den verschiedenen Proben. Dazu werden die modifizierten Peptide bioinformatisch in den Spektren identifiziert, was Aufgrund der hohen Anzahl an möglichen Permutationen oft nur separiert mit hinreichender Genauigkeit möglich ist. Im Anschluss wird das Verhältnis aus dem Integral des Signals des modifizierten Peptides und dem aller identifizierten Spezies des Peptides gebildet (Formel 1). In Experimenten mit mehreren Replikaten sind die redundanten Identifikationen der Peptide zu berücksichtigen, Modifikationen an verschiedenen Aminosäuren werden hier zur Quantifizierung der gesamt Oxidation zusammengefasst. Es ist möglich die Oxidationsrate zu bestimmen in dem die Intensitäten der Peptide mit den Bestrahlungsintensitäten über eine lineare Funktion Korreliert werden [27]. Dies ist Möglich da die Entstehung von Radikalen, auch wenn nicht alle Spezies und nur ein Anteil dieser zur Proteinmodifikation beiträgt, bereits gut charakterisiert ist. So ist bekannt das zwischen 2,4 bis 4,2 Radikale/ 100eV zugeführter Energie entstehen. Der Unterschied kommt durch ein nicht direkt proportionales Verhalten der Radikal Entstehung zu Scavenger-Effekten anderer Substanzen im Lösungsmittel zustande. Diese teilen sich immer in gleiche Verhältnisse der verschiedenen Spezies (so bilden ca. 40% der Hydroxyl Radikale Wasserstoffperoxid), und ihre Verteilung verhält sich proportional zur Dimensionen des Spur. Die gewonnen Daten können über die gesamt Intensität einer Label freien Quantifizierung (z.B. MaxQuant), nicht bestrahlte, zugegebene Proteine bekannter Konzentration

on oder Fluoreszenz Farbstoffe welche mit Hydroxylradikalen reagieren, wie Alexa, normalisiert werden. Bei letzterer Methode erzeugt Daten sind direkt mit der Hydroxylradikal Konzentration korreliert.

(Formel 1)

$$\frac{\sum_{d=1}^n d \left(\frac{f_{\text{mod. PeptidPeak}}}{f_{(\text{mod.} + \text{unmod. PeptidPeaks})}} \right)}{\text{Anzahl Identifikationen}}$$

n = Anzahl Replikate
d = Replikat

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Proteine

Chemikaliertabelle					
Name	Formel	Hersteller	Molmasse (g/mol)	Produktnr.	CAS-Nummer
Natriumdihydrogenphosphat	NaH ₂ PO ₄ +H ₂ O	Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe, G	137,99	K300.1	13472-35-0
Salzsäure	HCL	Merck KGaA, Darmstadt, G	36,46	1.00319.1000	7647-01-0
Natriumhydroxid	NaOH	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA	39,997	3620	1310-73-2
Ammoniumacetat	NH ₄ COOH	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, G	77,08	39750	631-61-8
Glycerin	C ₃ H ₈ O ₃	Merck KGaA, Darmstadt, G	92,09	1.04092.100	C ₃ H ₈ O ₃
SDS (Natriumlaurylsulfat)	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, G	288,4	91069	151-21-3
DTT (Dithiothreitol)	C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂	Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe, G	154,25	6908.1	7634-42-6
IAA (2-Iodacetamid)	C ₂ H ₄ I ₂ NO	Merck KGaA, Darmstadt, G	184,96	L59087244020	144-48-9
Acetonitril	C ₂ H ₃ N	Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe, G	41,05	8825.1	75-05-8
Ameisensäure	HCOOH	Merck KGaA, Darmstadt, G	46,03	822254298	64-18-6
Harnstoff	CH ₄ N ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, G	60,06	1.08487.1000	57-13-6
Amoniumbicarbonat	NH ₄ HCO ₃	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA	79,06	A6142-500 6	1066-33-7
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid	C ₈ H ₁₈ N ₃ Cl	Pierce Protein Biology Products, part of Thermo Fisher Scientific AG, Rockford, USA	191,70	22980	25952-53-8
Alexa Fluor 488 Hydroxylamin	C ₄₀ H ₆₀ N ₇ O ₁₂ S ₂	Life Technologies AG, ehemals Invitrogen AG, Carlsbad, USA	895,07	A30629	-
Aceton	C ₃ H ₆ O	Merck KGaA, Darmstadt, G	58,08	8.22251.1000	67-64-1
Sulfo-N-Hydroxysuccinimid	C ₄ H ₄ NNaO ₆ S	Pierce Protein Biology Products, part of Thermo Fisher Scientific	217,13	24510	106627-54-7

Tabelle 3: Tabelle aller während der Arbeit verwendeten Chemikalien (Proteine werden einzeln geführt)

Proteine			
Proteine	Hersteller	Molmasse (g/mol)	Produktnr.
Betal-Lactoglobulin A, ≥90 % from bovine milk	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA	18686	L3908
Trypsin, modified Sequencing Grade	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhelrn, G	23300 Da	11418025001
Cytochrom c, ≥95 %	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA	12327	C3131-10MG
Ribonuklease A, >70 units/mg	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA	13700	R6513-10MG
Calmodulin (bovine) BioUltra ≥98 %	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA	16790 Da	P1431
Melittin from honey bee venom ≥90 %	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA	2846,46 Da	M1407

Tabelle 4: Tabelle aller während der Arbeit verwendeten Proteine.

3.2 Geräte

Geräte		
Bezeichnung	Gerätetyp	Hersteller
Elektronika U-003	10 MeV Linearbeschleuniger	N/A
Concentratorplus Vacufuge	Vakuumentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermomixer compact	Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
LTQ Orbitrap XL ETD	Massenspektrometer	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Milli Q Reference A+	Reinstwasseranlage mit TOC- Indikator	Millipore
nanoAcquity UPLC System (2 u. 15 cm C18 Säulen)	nano-HPLC-System	Waters GmbH, Eschborn, Deutschland
Fluoromax 4 Spectrofluorometer	Fluorometer	Horiba Scientific Ltd., Edison New Jersey, USA
Triversa NanoMate	Chipbasierte Elektrosprayquelle	Advion

Tabelle 5: Tabelle aller während der Arbeit verwendeten Instrumente

3.3 Software

Software		
Software	Version	Provider/ Entwickler
MaxQuant	2.0.18	Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Deutschland
XCalibur	2.1.0.1139	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutsch- land
ProteoWizard Toolkit	3.0.3780	Mallick lab, Spielberg Family Center for Applied Pro- teomics, Seattle, USA
Proteome Discoverer	1.2	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutsch- land
StavroX	2.0.6	Institute of Biochemistry and Biotechnology, Martin- Luther University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Deutschland
Pymol	1.3	Schrödinger LCC, Portland, USA

Tabelle 6: Tabelle aller während der Arbeit verwendeten Software

3.4 Experimente

Wie in den Tabellen 7-9 für die einzelnen Probenreihen angegeben wurde Betalactoglobulin mit einem Natriumdihydrogenphosphatpuffer sowie ggf. dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa und weiteren Proteinstandards in einem nano-HPLC-Vial gemischt und über Nacht ggf. unter N₂O- oder O₂-Atmosphäre equilibriert. Die Proteinlösungen wurden mit definierten Pulslängen und Dosen bestrahlt und anschließend ggf. durch Zugabe von Tris-HCl gequenchet. Die bestrahlten Proben wurden anschließend direkt in-Lösung oder nach gelelektrophoretischer Trennung im Gel mittels Trypsin gespalten. Die resultierenden Peptidmischungen wurden mittels MS gemessen und anschließend analysiert.

3.4.1 Vorbereitung Protein- und Pufferlösungen

Für die Bestrahlung wurde Betalactoglobulin (Stammlösung 1 mg/ml in Wasser, finale Konzentration nach Mischung 20 µM) in Natriumdihydrogenphosphatpuffer (Roth, K300.1, finale Konzentration jeweils 20 mM) gelöst (siehe Tabellen 7-9). Die Puffer wurden mittels Reinstwasseranlage (Millipore Milli Q Reference A+) gefiltertem Wasser hergestellt. Der Phosphatpuffer wurde mittels Natriumhydroxyd und Salzsäure auf den pH-Wert 7.0 eingestellt. Als Protein wurde Betalactoglobulin A, gefriergetrocknet von Sigma Aldrich mit einer Reinheit von über 90 %, eingesetzt.

Nach der Bestrahlung wurden zur Ermöglichung einer Normalisierung der gemessenen Peptidintensitäten entsprechend der Tabelle 8 ggf. Cytochrom-C und Ribonuklease A als Standards zu den Proben gegeben. Die Endkonzentration der Proteine betrug jeweils 5 µM.

3.4.2 Gasaustausch

Die Proben wurden entsprechend den Tabellen 7-9 ggf. vor einer Bestrahlung über Nacht mit O₂ oder N₂O begast. Dazu wurden die Proben, welche mit N₂O begast wurden stabil und offen in einem Polyethylenbeutel, dessen Atmosphäre fünfmal durch Druck minimiert und das Volumen im Anschluss mit reinem N₂O aufgefüllt wurde, gestellt. Im Anschluss wurden die Proben, durch den Beutel isoliert, ohne sie wieder der Standard-Atmosphäre auszusetzen, in einem Exsikator ruhen gelassen und bei 4°C gekühlt. Zur Kontrolle wurden je zwei Proben nicht begast.

3.4.3 Bestrahlung

Die Bestrahlung wurde am IOM Leipzig mit dem 10 MeV Linearbeschleuniger Elektronika U-003 durchgeführt. Die Anlage ist in der Lage Elektronen eine Energie von 4 bis 10 MeV zuzuführen. Dabei wird die Bestrahlungsintensität durch die Justierung des Kathodenstroms und der Pulslänge wesentlich bestimmt. Im Wesentlichen steht der Kathodenstrom für die Anzahl an beschleunigten Elektronen die die Anlage in einer bestimmten Zeiteinheit verlassen und die Pulslänge für ein Vielfaches dieser Zeiteinheit über welche die Proben diesen ausgesetzt sind. Die Pulslänge wird in s angegeben während der Kathodenstrom nur dimensionslos in Skaleneinheiten (SKT) der Anlage bekannt war. Die im weiteren angegebenen Strahlen- bzw. Energiedosen resultieren aus der standardisierten Dichromat-Dosimetrie (SO / ASTM51401 – 03). Die Energiedosis beschreibt die von einer Masse aufgenommene Energie und ist somit Stoff abhängig und dient nur als Anhaltspunkt für die von Wasser aufgenommene Energie. Bei allen Experimenten wurden Impulslängen von minimal 25 ns bis maximal 2 µs genutzt. Die Proben wurden in diesem und allen folgenden Experimenten nur Einzelpulsen ausgesetzt. Über fotoreaktive Folien konnte die Streuung der Elektronen beim Auftreffen abgeschätzt werden. Bei allen Bestrahlungen wurde von einem Bereich von circa 3,3 cm² ausgegangen welcher in voller Intensität bestrahlt wird (4,2 cm² mit stark abfallender Intensität). Die Proben wurden wie in den Tabellen 7-9 beschrieben in der Anlage bestrahlt. Als Kontrolle wurden unbestrahlte Proben erstellt. Zur Verhinderung von sekundä-

ren Oxidationen in den Proben wurde im Zeitfenster von einer Minute nach der Bestrahlung entsprechend Tabellen 7-9 ggf. 1 μ l 1 M TRIS-HCL zugegeben.

3.4.4 Bestimmung der effektiven Dosis mittels Alexa 488

Alexa 488 von Invitrogen wurde zu einer Endkonzentration von 20 μ M zugegeben um die Radikalbildung direkt zu bestimmen. Das Ringsystem von Alexa 488 reagiert direkt mit den Hydroxyl-Radikalen und sekundären Oxiden, wobei das Alexa seine Fluoreszenzemission verliert. Die Fluoreszenz Messungen wurden im Horiba Scientific Fluoromax 4 Spectroluorometer bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm gemessen. Die Emissionswellenlänge liegt bei 519 nm. Es wurde für alle Messungen eine Spaltbreite von 2 nm verwendet.

3.4.5 1D-SDS-Page

3,4 μ g (oder die Gesamtmenge) an Proben wurden auf einem 12% Polyacrylamidgel getrennt. Die Zusammensetzung des Gels folgte Standardprotokollen der Laufpuffer enthielt 60,5 g TRIS, 288 g Glycerin (Merck, 1.04092.100) und 20 g SDS (Serva, 091069). Das Protein wurde bei 20 mA und 300 V im Gel laufen gelassen. Die Proben sollten im Gel von niedermolekularen Ladungsträgern befreit und vorgetrennt werden. SDS denaturiert das Protein dabei durch den Bruch der Wasserstoffbrücken-Bindungen. DTT oder Mercaptoalkohole im Probenpuffer brechen Disulfidbrücken.

3.4.6 Tryptischer In-Gel Verdau

Zur Messung in der LC-MS müssen das Protein in spezifische Peptide gespalten und aus der Gelmatrix entfernt werden. Dazu werden nach der beendeten Gelelektrophorese die Proteinbanden mittels Coomassie-Blau gefärbt. Die Banden des Proteins mit einer Größe von circa 20.000 kDa wurden in jeder Bahn in mit

der Bandengröße identischen Stücken ausgeschnitten. Die Proben wurden im Anschluss für 30 min bei Raumtemperatur in einem Eppendorf Thermomixer compact bei 850 rpm in einer Lösung aus 50 % Acetonitril (Roth, 8825.1) inkubiert. Die organische Phase löst den Coomassie-Farbstoff aus der Gelmatrix und wird danach verworfen. Es wurde jeweils genug Lösung benutzt um alle Gelstücke großzügig zu überschichten. Dies wurde dreimal bis zur vollständigen Entfernung des Farbstoffes vorgenommen. Im Anschluss wurde das Gel in rein organischer Phase für 5 Minuten dehydriert, dazu wurde Acetonitril verwendet. Als Enzym nehmen Proteasen eine komplexe räumliche Struktur ein, um die Backbone des Probenmoleküls erreichen zu können und um etwaige nicht primäre kovalente Bindungen wie Disulfidbrücken zu lösen wird die Probe reduziert. Die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen durch Luftsauerstoff wird dabei verhindert, sie werden zum Thiol reduziert. Dies wurde mittels Zugabe von 60 µl 10 mM DTT's (Roth, 6908.1) für 30 Minuten bei Raumtemperatur realisiert. Die Alkylierung wurde nach der Entfernung des DTT mit 100 mM Iodacetamid (Merck, L59087244) in 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss durchgeführt. Das Iod-Acetamid wurde im Anschluss entfernt und die Gelfragmente in reinem Acetonitril dehydriert. Zur kompletten Entfernung aller Lösungsmittel wurden die Gelstücke in der Eppendorf Concentratorplus Vacufuge Vakuumzentrifuge bei 60°C und 14000 rpm für 10 Minuten im Programm für Lösungen mit hohem Dampfdruck getrocknet. Danach wurden die Proben mit Trypsinpuffer überschichtet und Trypsin (Roche, 11418025001) im Verhältnis 1:20 zugegeben. Die Proben wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert und der Verdau im Anschluss mit 10 µl 10 % Ameisensäure (Merck, 822254298) gestoppt. Für die Extraktion wurden jeweils 80 µl einer Lösung aus 50 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure verwendet. Acetonitril verhindert dabei die Adsorption der Peptide an Gefäß und Pipettenspitze, Ameisensäure extrahiert basische Peptide über Wechselwirkung. Der Vorgang wurde jeweils zwei Mal wiederholt und die gesammelte Extraktionslösung in der Eppendorf Concentratorplus Vacufuge Vakuumzentrifuge bei 60 °C und 14000 rpm für 10 Minuten im Programm für Lösungen mit hohem Dampfdruck getrocknet. Die Peptide wurden in 20 µl 0,1 % Ameisensäure resuspendiert.

3.4.7 Tryptischer in-Lösungsverdau

Ein Probenvolumen das 3,4 µg Probe entspricht wurde in der Eppendorf Concentratorplus Vacufuge Vakuumentrifuge bei 60 °C und 14000 rpm für 10 Minuten im Programm für Lösungen mit hohem Dampfdruck komplett eingetrocknet und folgend in 20 µl 8 M Harnstoff (gelöst in Ammoniumbicarbonat-Puffer) reiluiert. 1 M Armoniumbicarbonat wurde verwendet um die Probe auf einen pH-Wert von 7-8 einzustellen. Mittels 1 µl 1 M DTT wurden die Proben wurden im Anschluss für eine Stunde im Thermocycler bei genau 37 °C reduziert. Die Zugabe von 20µl 100 mM Iodacetamid startete die Alkylierung der Proben. Es wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln alkyliert. Überschüssiges IAA wurde mittels weiterer 4 µl DTT entfernt. Es ist notwendig die Harnstoffkonzentration vor dem Verdau zu verringern. Dafür wurden 20 µl Ammoniumbicarbonatpuffer zugegeben. In Trypsinpuffer alequotiertes Trypsin wurde zu eine Endkonzentration zugegeben welche einem Verhältnis von 1:20 (Trypsin:Probe) entspricht. Inkubiert wurde über Nacht bei 37 °C, der Verdau wurde mit 1 µl 10% Ameisensäure gestoppt. Es wurde darauf geachtet dass der pH-Wert für die anschließende Trennung mit dem Flüssigkeitschromatographen unter 3 liegt.

3.4.8 Nano-Hochleistungsflüssigchromatographie/nano-Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie

Die Proben aller Experimente wurden mittels einer Nano-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/ Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (nano-HPLC/nano-ESI-MS) an einem Orbitrap-Massenspektrometer (LTQ Orbitrap XL ETD, Thermo Scientific) gemessen, welches online über Chip-basierte Elektrosprayquelle (Triversa NanoMate, Advion) an ein nano-HPLC-System (nanoAcquity, Waters) gekoppelt ist. Nach Injektion und anschließender Entsalzung der Proben auf einer Vorsäule (Länge, 2 cm, C18-Material, Waters, verwendete Flussrate 15 µl/min) erfolgte die chromato-

graphische Trennung mit einer Flussrate von 300nl/min auf einer C18-Saeule (15 cm, Waters). Es wurde ein 70 min-Gradient verwendet, währenddessen der Verhältnis von Laufmittel B (Acetonitril, 0.1% Ameisensäure) zu A (Wasser, 0.1% Ameisensäure) von 2 auf 40% gesteigert wurde. Von den Proben wurden jeweils 9 µl injiziert. Als MS-Methode wurde eine sogenannte Top-6-MS-Methode verwendet. Automatisch wurde nach einem Delay von 10 min über die gesamte verbleibende LC-MS-Messzeit alternierend je 1 MS-Vollscan in der Orbitrap mit einer Massenauflösung von 60.000 gefolgt von 6 MS/MS-Scans von den intensivsten gerade eluierenden Peaks in der Ionenfalle aufgenommen. Ein solcher Messzyklus dauert etwa 2 Sekunden.

3.4.9 Datenauswertung und Software

Die Daten wurden auf das Verhalten der unmodifizierten und modifizierten Peptide der Probenproteine nach dem prinzipiellen Verfahren nach 2.2.3 analysiert. Unmodifizierte Peptide wurden mittels MaxQuant [28] labelfrei quantifiziert. Die Parameter wurden auf eine Proteinspaltung mit Trypsin und eine maximale Anzahl verpasster Schnittstellen von 2 gesetzt. Massengenauigkeiten von 20 ppm für die First Search und 5 ppm für die Mainsearch wurden genutzt. Beide Suchen wurden auf zwei Datenbanken angewandt. Diese bestanden aus der in MaxQuant beinhalteten Kontaminanten-Datenbank, welche häufig auftretenden Verunreinigungen im Arbeitsbereich der Proteomik abdeckten, und der Sequenz des verwendeten Betalactoglobulin. Die False Discovery Rate wurde für Peptide und Proteine auf 0.01 gesetzt. Die raw Dateien der Massenspektren der Thermoftware Xcalibur wurden mittels msconvert aus dem Protein Wizard Toolkit in mgf Dateien umgewandelt [29]. Die Quantifizierung der modifizierten Peptide und die Identifikation der modifizierten Aminosäuren wurde über einen Workflow des Thermo Proteome Discoverer 1.2 realisiert. Dabei wurden die Replikate der einzelnen Proben jeweils zusammengefasst. Die Spektren wurden in einem Massenbereich von 350-5000 Da ausgewählt und gruppiert. Dabei wurden nur Spektren zu derselben Gruppe annotiert wenn ihre Vorläuferionmasse nicht

mehr als 5 ppm voneinander abwich und sie nicht länger als 5 Minuten voneinander entfernt gemessen wurden. Die Spektren wurden mittels Sequest über die Swissprot Datenbank Release 2012_01 vom 25.1.2012 mit 534242 Sequenzen annotiert. Weitere Suchen wurden über eine Datenbank mit der Sequenz von 1BSY und typischen Kontaminanten durchgeführt. Die False Discovery Rate (FDR) lag dabei im strengen Bereich bei 0.01 und relaxet bei 0.05. Die Vorläuferionen-Massentoleranz wurde auf 10 ppm gesetzt, MS/MS Fragmente durften um 0,5 Da abweichen. Peaks wurden im Event Detector mit einer Massengenauigkeit von 2 ppm akzeptiert und die Peakfläche mittels des Area Detectors aus den Spektren integriert. Vernetzte Peptide in den Massenspektren wurden mittels StavroX identifiziert [30]. Alle Grafen wurden mittels Microsoft Excel erstellt. Proteinstrukturen wurden mittels Pymol 1.3 visualisiert.

3.4.10 Untersuchung des Calmodulin/Melittin-Komplexes

In einem Testversuch wurde anstatt Betalactoglobulin Calmodulin bzw. der Calmodulin-Melittin-Komplex (Tabelle 8) untersucht. Das Probenvolumen wurde für diese Messreihe auf 30 µl erhöht. Calmodulin und Melittin wurden mit einer finalen Konzentration von 12 µM eingesetzt. Es wurde sowohl ein Quenching sowie eine Untersuchung der Alexa-Fluoreszenz wie für Betalactoglobulin beschrieben, durchgeführt.

Probentabelle 1

#	Puffer	Protein	Atmosphäre	Bestrahlungsbed.
1	20mM Natriumdihydrogenphosphat pH7.0, *	Betalactoglobulin A (bovine) 20 µM	N ₂ O	25ns, 44Skt, 125Gy
2	20mM Natriumdihydrogenphosphat pH7.0 *	Betalactoglobulin A (bovine) 20 µM	N ₂ O	25ns, 44Skt, 125Gy
3	20mM Natriumdihydrogenphosphat pH7.0 *	Betalactoglobulin A (bovine) 20 µM	N ₂ O	1□s, 44Skt, 240Gy
4	20mM Natriumdihydrogenphosphat pH7.0 *	Betalactoglobulin A (bovine) 20 µM	N ₂ O	1.5□s, 44Skt, 580Gy
5	20mM Natriumdihydrogenphosphat pH7.0 *	Betalactoglobulin A (bovine) 20 µM	N ₂ O	2.1□s, 44Skt, 1100Gy
6	20mM Natriumdihydrogenphosphat pH7.0 *	Betalactoglobulin A (bovine) 20 µM	N ₂ O	4□s, 44Skt, 2100Gy
7	20mM Natriumdihydrogenphosphat pH7.0 *	Betalactoglobulin A (bovine) 20 µM	Luft	1.5□s, 44Skt, 580Gy

Tabelle 7: Alle Parameter der Proben des ersten Experiments.

* Proben wurden nach der Bestrahlung mit Tris-HCL zu einer finalen Konzentration von 50 mM gequench

Probentabelle 2

#	Puffer	Protein	Atmosphäre	Bestrahlungsbed.	Replikate
1-3	20mM Natriumdihydrogenphosphat pH7.0, *	Betalactoglobulin A (bovine) 20 μ M, **	N ₂ O	0Gy	3
4-6	20mM Natriumdihydrogenphosphat pH7.0, *	Betalactoglobulin A (bovine) 20 μ M, **	N ₂ O	25ns, 44Skt, 106Gy	3
7-9	20mM Natriumdihydrogenphosphat pH7.0, *	Betalactoglobulin A (bovine) 20 μ M, **	N ₂ O	1,2 μ s, 40Skt, 240Gy	3
10-12	20mM Natriumdihydrogenphosphat pH7.0, *	Betalactoglobulin A (bovine) 20 μ M, **	N ₂ O	1,5 μ s, 32Skt, 580Gy	3

Tabelle 8: Alle Parameter der Proben des zweiten Experiments.

* Proben wurden nach der Bestrahlung mit Tris-HCL zu einer finalen Konzentration von 50 mM gequenchet

** Proben wurde beim quenchen RNase A und Cytochrom c zu einer Endkonzentration von 5 μ M zugegeben

Probentabelle 3, erste Messreihe

#	Lösung	Protein	Atmosphäre	Bestrahlungsbed.	Replikate
1	20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7.0, 5 μ M Alexa 488, *	-	O ₂	0 Gy	2
2	20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7.0, 5 μ M Alexa 488, *	-	O ₂	1,3 ns, 20 Skt, 540 Gy	2
3	20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7.0, 5 μ M Alexa 488, *	-	O ₂	1,3 ns, 40 Skt, 790 Gy	2
4	20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7.0, 5 μ M Alexa 488, *	-	O ₂	2,0 ns, 40 Skt, 1120 Gy	2
5	20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7.0, 5 μ M Alexa 488, *	Betalactoglobulin A (bovine) 20 μ M	O ₂	0 Gy	1
6	20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7.0, 5 μ M Alexa 488, *	Betalactoglobulin A (bovine) 20 μ M	O ₂	1,3 ns, 20 Skt, 540 Gy	1
7	20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7.0, 5 μ M Alexa 488, *	Betalactoglobulin A (bovine) 20 μ M	O ₂	1,3 ns, 40 Skt, 790 Gy	1
8	20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7.0, 5 μ M Alexa 488, *	Betalactoglobulin A (bovine) 20 μ M	O ₂	2,0 ns, 40 Skt, 1120 Gy	1
9	20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7.0, 5 μ M Alexa 488, *	Betalactoglobulin A (bovine) 20 μ M	N ₂ O	0 Gy	1
10	20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7.0, 5 μ M Alexa 488, *	Betalactoglobulin A (bovine) 20 μ M	N ₂ O	1,3 ns, 20 Skt, 540 Gy	1
11	20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7.0, 5 μ M Alexa 488, *	Betalactoglobulin A (bovine) 20 μ M	N ₂ O	1,3 ns, 40 Skt, 790 Gy	1
12	20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7.0, 5 μ M Alexa 488, *	Betalactoglobulin A (bovine) 20 μ M	N ₂ O	2,0 ns, 40 Skt, 1120 Gy	1

Tabelle 9a: Alle Parameter der Proben des dritten Experiments

* Proben wurden nach der Bestrahlung mit Tris-HCL zu einer finalen Konzentration von 50 mM gequenchet.

Probentabelle 3, zweite Messreihe

#	Lösung	Protein	Atmosphäre	Bestrahlungsbed.	Replikate
1	20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7.0, 5 µM Alexa 488, *	Calmodulin 12 µM	O ₂	0Gy	2
2	20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7.0, 5 µM Alexa 488, *	Calmodulin 12 µM	O ₂	1,3 ns, 20 Skt, 540 Gy	2
3	20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7.0, 5 µM Alexa 488, *	Calmodulin 12 µM	O ₂	1,3 ns, 40 Skt, 790 Gy	2
4	20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7.0, 5 µM Alexa 488, *	Calmodulin 12 µM	O ₂	2,0 ns, 40 Skt, 1120 Gy	2
5	20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7.0, 5 µM Alexa 488, *	Calmodulin 12 µM	O ₂	0 Gy	1
6	20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7.0, 5 µM Alexa 488, *	Melittin 12 µM	O ₂	1,3 ns, 20 Skt, 540 Gy	1
7	20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7.0, 5 µM Alexa 488, *	Melittin 12 µM	O ₂	1,3 ns, 40 Skt, 790 Gy	1
8	20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7.0, 5 µM Alexa 488, *	Melittin 12 µM	O ₂	2,0 ns, 40 Skt, 1120 Gy	1

Tabelle 9b: Alle Parameter der Proben des dritten Experiments.

* Proben wurden nach der Bestrahlung mit Tris-HCL zu einer finalen Konzentration von 50 mM gequenchet

3.5 Crosslinking Experiment

3.5.1 Crosslinking Reaktion

Betalactoglobulin (20 µM) wurde in einem 20 mM Natriumdihydrogenphosphatpuffer bei einem pH-Wert von 6,8 mit dem Zerolength Crosslinker 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) in einer Konzentration von 10 mM unter Zugabe von Sulfo-N-Hydroxysuccinimid (10 mM) für 0, 30 und 120 Minuten zur Reaktion gebracht.

3.5.2 Aceton Fällung

Die Proben wurden zur Entsalzung und Aufkonzentrierung durch die Zugabe von Aceton (-20 °C) im Verhältnis 1:2 gefällt. Die Proben wurden im Anschluss 5 Minuten inkubiert und für weitere 5 Minuten bei 4 °C und 13400 rpm abzentrifugiert. Im Anschluss wurden die Proben bei -80 °C für eine halbe Stunde in-

kubiert. Nach einem weiterem abzentrifugieren bei 4°C und 13400 rpm wurde der Überstand sofort abgenommen und mit Trypsin proteolytisch gespalten.

3.5.3 Tryptischer Lösungsverdau

Der Verdau der Crosslinking Proben wurde analog zu 3.4.7 vorgenommen.

3.5.4 LC-MS und MS/MS

Die LC-MS-Messungen erfolgten analog der Messungen der Footprinting-Proben.

3.5.5 Datenauswertung und Software

Für die Identifizierung wurden die Rohdatenfiles mit der Software Proteome Discoverer (Thermo Fisher) in das herstellerunabhängige Datenformat mgf umgewandelt. Die mgf-Files wurden StavroX eingeladen und unter Berücksichtigung der Proteinmodifikationen Carbamidomethylierung von Cysteinen sowie der Oxidation von Methioninen sowie von bis zu 3 übergangenen tryptischen Spaltstellen und einer Massenabweichung von bis zu 10 ppm wurden vernetzte Peptide gesucht. Die experimentellen MS/MS-Spektren der potentiellen Crosslinkingprodukte wurden mit theoretischen Spektren abgeglichen und deren Korrelation durch StavroX bewertet sowie manuell evaluiert.

4 Ergebnisse

4.1 Optimierung der Bestrahlungsintensität

Die effektiv erzielten Dosen unterschiedlicher Beschleuniger sind schwer mit einander zu vergleichen. Als ein geeignetes Maß für die Abschätzung der erzielten Radikaldosis hat sich die Messung des Fluoreszenzverlustes von Alexa 488 erwiesen. Die durch die Bestrahlung induzierte Hydroxyl-Radikal-Ausbeute wurde über den Fluoreszenz-Farbstoff Alexa 488 ermittelt. Der Abfall der Intensität über die Bestrahlungsdosis wurde in Abbildung 7 aufgetragen. Vorexperimente zeigten lineares Verhältnis der Fluoreszenz zur Alexa Konzentration.

Es wurde zunächst untersucht, ob und welche der eingesetzten Dosen (0, 540, 780 Gy) in einer Intensitätsverringering der Fluoreszenz von Alex 488 resultieren, die eine ausreichende und nicht übermäßige Modifikation der ausgewählten Proteine vermuten lässt. Es wurde ein logarithmischer Verlust der Fluoreszenz der Probe beobachtet (Abbildung 4). Die Dosis 540 Gy resultierte in einem Fluoreszenzverlust von 62 %, 780 Gy in einem Verlust von 75 % und erreicht damit von Chance et al. beschriebene ideale Werte [32] um ausreichende Modifikationen zu erzeugen ohne das Auftreten von sekundären Oxidationen oder unspezifischen Backbonebrüchen zu begünstigen.

Emissionsverlust von Alexa 488 durch Bestrahlung im linear Beschleuniger

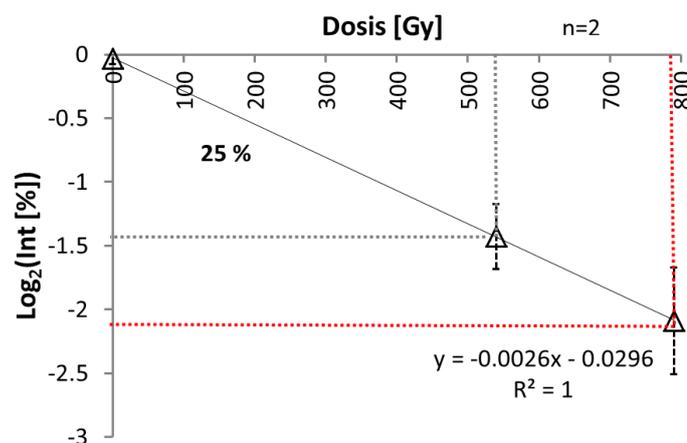


Abbildung 4: Verlust der Alexa Fluoreszenzintensität im \log_2 auf die Dosis in Gy aufgetragen. Der prozentuale Emissionsverlust ist markiert. Die als ideal angenommene Dosis welche zu einem Fluoreszenzverlust von 25 % führt ist in rot markiert

4.2 Einfluss des Proteinsystems

Es ist bekannt, dass Protein unterschiedlich stark als Scavenger wirken und damit die effektive Radikalkonzentration beeinflussen. Die Alexa-Fluoreszenz kann zur Normierung verwendet werden.

In Abbildung 5 wurden unterschiedliche Proteine auf ihre Wirkung als Hydroxyl-Radikal Akzeptor geprüft. Der Protein-Komplex aus Calmodulin und Melittin in welchem einige reaktive Aminosäuren abgeschirmt sein sollten zeigt einen niedrigeren Intensitätsverlust als die Probe reinen Calmodulins. Alle Proteinproben zeigen einen Scavenger Effekt auf die Hydroxylradikale, die Proben reinen Alexas zeigen einen signifikant höheren Intensitätsverlust.

Emissionsverlust mit Unterschiedlichen Proteinkonzentrationen und Protein/ Proteinkomplex

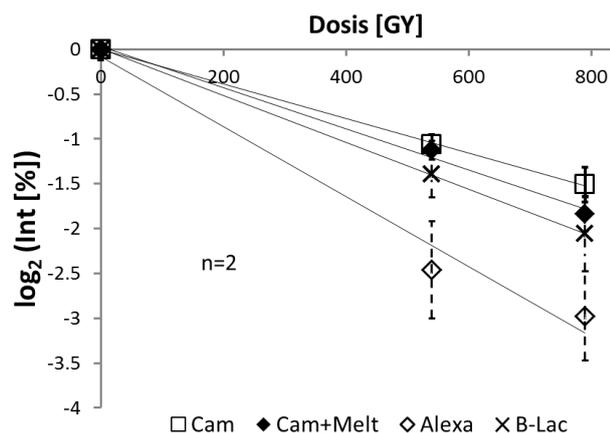
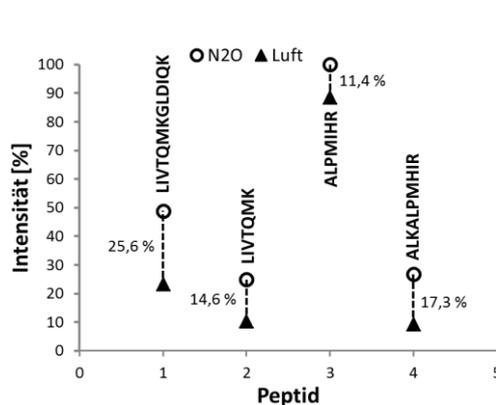


Abbildung 5: Vergleich des Intensitätsverlustes von Alexa 488 zwischen der Hydroxyl-Radikal Scavenger Wirkung von Betalactoglobulin, Calmodulin und dem Calmodulin-Melittin Komplex.

4.3 Einfluss der Probenbegasung

Ein weiterer in der Literatur als einflussreich beschriebener Parameter ist die Art des Gases, mit welchem die Lösung gesättigt wurde. Abbildung 6 zeigt den Vergleich der Intensitäten der ersten Bestrahlten Proben des Proteins Betalactoglobulin. Von allen tryptischen Peptiden mit auftretender Methioninoxidation wurden die Ionenstrom-Intensitäten aufgetragen. Die Normalisierung erfolgte über die LFQ (Labelfreie Quantifizierung) Intensitäten und wurden in Prozentanteilen zum maximal Wert aufgetragen. Eine N₂O-Begasung zeigt konstant höhere Ionenstrom-Intensitäten. Der durchschnittliche Abstand zu den N₂O begasten Proben beträgt 13,38 %. Abbildung 7 zeigt die Fluoreszenzemission zweier Proteinproben (5mM Betalactoglobulin) mit Alexa 488 welche unterschiedlichen Atmosphären ausgesetzt waren. Die N₂O begasten Proben zeigten eine erhöhte Hydroxylradikal-Ausbeute, die Intensitätsverringering ist über die Messreihe 54,5 % höher.

Vergleich Begasung über Ionenstromstärke



Vergleich bestrahlter Proben Alexa 488 + 5mM Betalactoglobulin unterschiedlicher Begasung

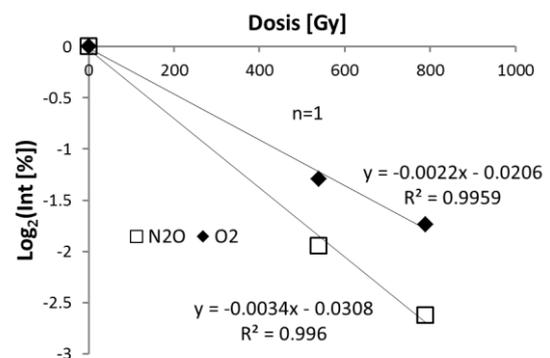


Abbildung 6: Vergleich der Intensitäten verschiedener Peptide mit Methioninoxidation in unterschiedlich gestalteten Proben, die prozentualen Abstände sind eingezeichnet. (n=1)

Abbildung 7: Vergleich der Fluoreszenzemission von Alexa 488 + 5 mM Protein mit N₂O und O₂ Begasung. (n=1)

4.4 Sequenzabdeckung und Intensität

Basierend auf den Voruntersuchungen wurde geprüft, über welche Sequenzbereiche von Betalactoglobulin mittels LC-MS abgedeckt werden können und damit mittels Radical Footprinting untersucht werden können.

Es wurden drei Bestrahlungsserien mit gleichen Konzentrationen an Betalactoglobulin durchgeführt. Tabelle 10 zeigt die Sequenzabdeckung über alle Experimente. Die Sequenzabdeckung beim Lösungsverdau betrug im Durchschnitt 81 % bei direkter Suche gegen die Sequenz von Betalactoglobulin. Im ersten Experiment (bis 2100 Gy) wurde gegen die Swissprot Datenbank eine Sequenzidentität von 60.11 % für das Protein P02754 erzielt (FDR < 5%). Die Sequenzen sind zu 89,9% identisch im globalen Alignment nach Needleman-Wunsch. P02754 ist ebenfalls als bovines Betalactoglobulin annotiert und unterscheidet sich im Wesentlichen nur durch eine n-terminale Insertion einer 16 Aminosäuren langen Sequenz die als Peptid in der Suche nie identifiziert wurde (Abbildung 9). Die Suchparameter enthielten keine dynamischen Modifikationen, die identifizierten Peptide enthielten nur Aminosäuren im unmodifizierten Zustand. Im zweiten Bestrahlungsexperiment (bis 620 Gy) betrug die Sequenzabdeckung 81,48 % bei einer Sequest-Suche über alle Messfiles bei einer False Discovery Rate < 5 % auf die Betalactoglobulin Datenbank, bei weniger stringenter FDR 100%. Dies stellt gleichzeitig die maximale Sequenzabdeckung bei strikter FDR dar die in allen Experimenten erreicht wurde. Die Peptide – WENDECAQKK- und -KYLLFCMENSAEQSLUCQ- konnten nie mit einer FDR unter 5% identifiziert werden. Die gleiche Suche über die Swissprot Datenbank erzielte eine Sequenzabdeckung von 69,66 %. In beiden Fällen erreichten die Kontrollen eine geringere Abdeckung als die ersten bestrahlten Proben.

**Sequenzabdeckung bei verschiedenen
Dosen in allen Experimenten**

Dosis	Experiment	FDR>5%	FDR<5%
0	2	100 %	81,48 %
0	1	56,74 %	52,81 %
106	2	69,11 %	39,11 %
125	1	60,11 %	60,11 %
280	2	51,69 %	35,96 %
580	1	56,74 %	39,33 %
620	2	49,44 %	19,10 %
1100	1	37,64 %	20,79 %
2100	1	39,33 %	34,83 %

Tabelle 10: die Sequenzabdeckung bei einem FDR-Treshhold von unter 5% und darüber für alle Experimente gegen die Swissprot Datenbank (Stand 2012).

Sequenzabdeckung bei unbestrahltem Betalactoglobulin

1	L I V T Q T M K G L	D I Q K V A G T W Y	S L A M A A S D I S L	L D A Q S A P L R	40
41	V Y V E E L K P T P	E G D L E I L L Q K	W E N D E C A Q K K I	I A E K T K I P A	80
81	V F K I D A L N E N	K V L V L D T D Y K	K Y L L F C M E N S A	E P E Q S L V C Q	120
121	C L V R T P E V D D	E A L E K F D K A L	K A L P M H I R L S F	N P T Q L E E Q C	160
162	H I				

Abbildung 8: Sequenzabdeckung Top-Sequestsuche gegen die Swissprot mit unmodifiziertem Betalactoglobulin

4.5 Aussagen bzgl. der Oberflächenzugänglichkeit basierend auf der Intensitätsabnahme unmodifizierter Peptide

Die Intensitäten aller im zweiten Experiment identifizierten Peptide wurden über die Sequenz aufgetragen (Abbildung 9). Man sieht in Abhängigkeit von der Dosis eine deutliche Intensitätsverringering – ein indirektes Maß für die Exposition der detektierten Sequenzen. Das Peptid 101-KYLLFCMENS A E P E Q S L V C Q C L V R - 124 ist bereits nach der ersten Bestrahlung nicht mehr identifizierbar. Bei einer Strahlendosis von 620 Gy konnten nur noch 3 Peptide identifiziert werden, bei 280 Gy sind es noch 15. Eine Einschränkung auf einzelne Aminosäuren ist jedoch mit diesen Daten nicht möglich. Die Graphen sind in den Abbildungen 13-

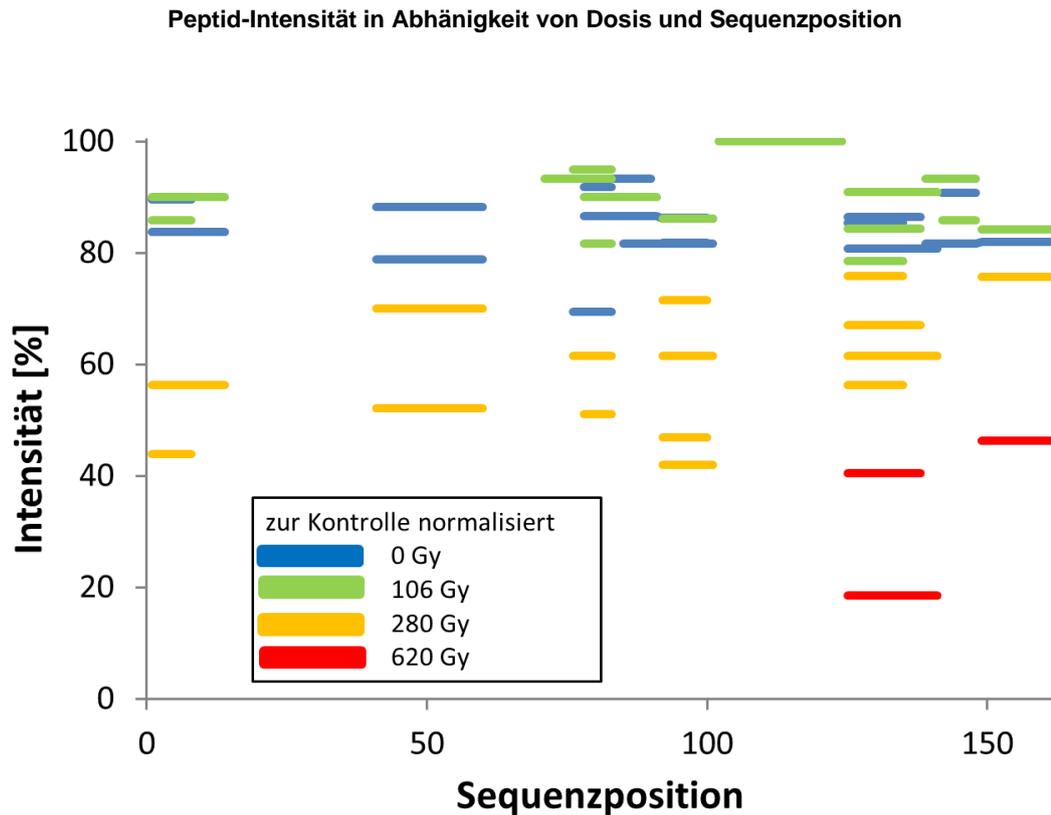
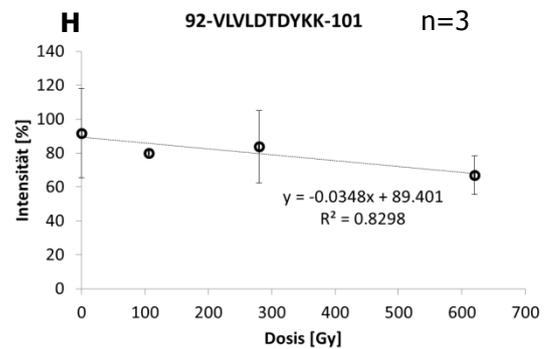
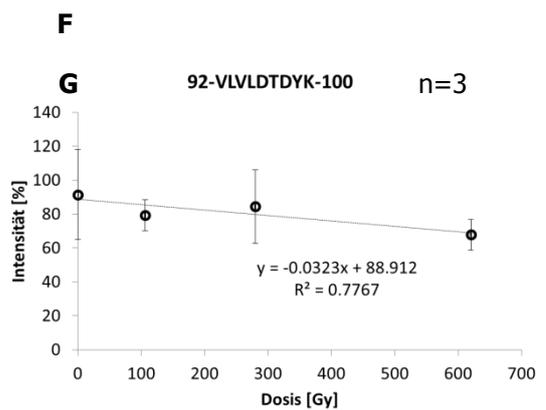
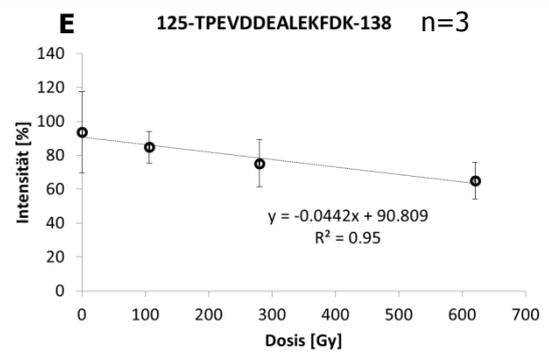
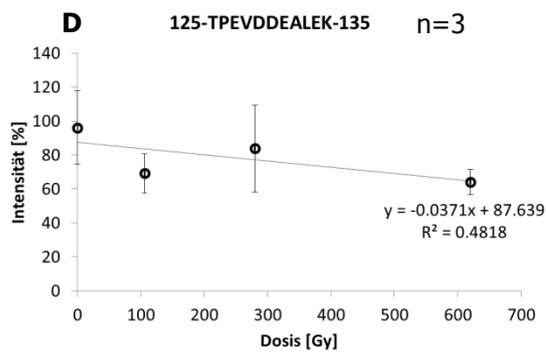
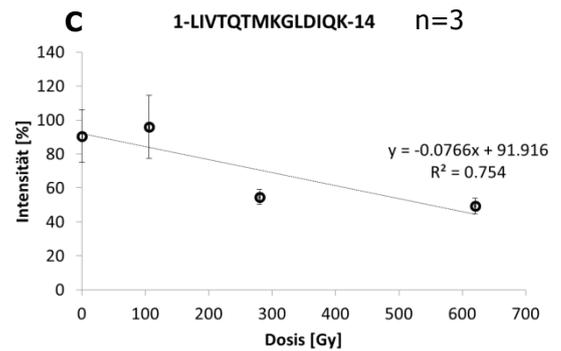
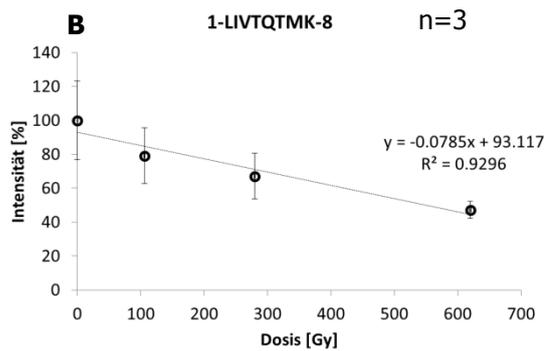
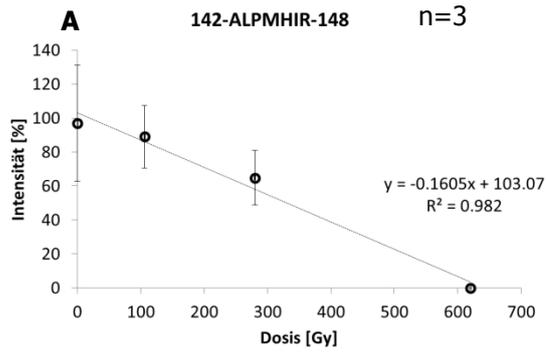
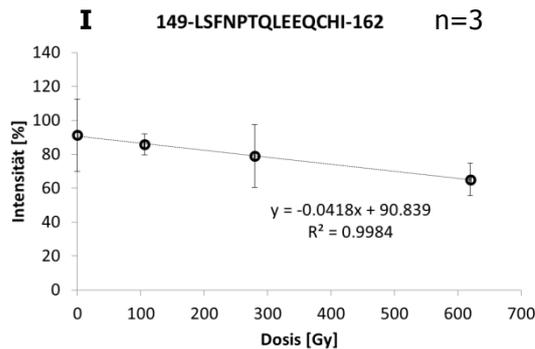


Abbildung 9: Intensität der Peptide als Prozentwert zur Maximalen Intensität von Beta-Lactoglobulin bei unterschiedlichen Dosen auf die Sequenz aufgetragen, die Intensitäten wurden auf die Konzentration der unbestrahlten Kontrollprobe normalisiert.

21 dargestellt. Die Werte wurden auf die gesamt Intensität des zugegebenen nicht bestrahlten Proteins bovine Ribonuklease normalisiert. Unter der Annahme einer hinreichenden linearen Regression fallen Methionin haltige Peptide durchschnittlich um 9,5 % ihrer Intensität pro 100 Gy höherer Strahlendosis ($\varnothing R^2=0,89$, Abb. 13-15). Die Peptide 125-135 (-TPEVDDEALALEK-) und 125-138 (-TPEVDDEALALEKFDK-) fallen um durchschnittlich 4,4% ($\varnothing R^2=0,72$, Abb. 12-14) enthält das Peptid zusätzlich die Aminosäuren 138-141 (-TPEVDDEALALEKFDK-) erhöht sich der Intensitätsverlust auf 7,0%. Das C-Terminale Peptid erreicht eine Verlustquote von 4,6% pro 100 Gy Dosiserhöhung bei einem signifikanten Bestimmtheitsmaß von 0.998 (Abb. 15). Alle anderen Peptide zeigen einen Verlust von 2,5% / 100 Gy ($\varnothing R^2=0,35$).



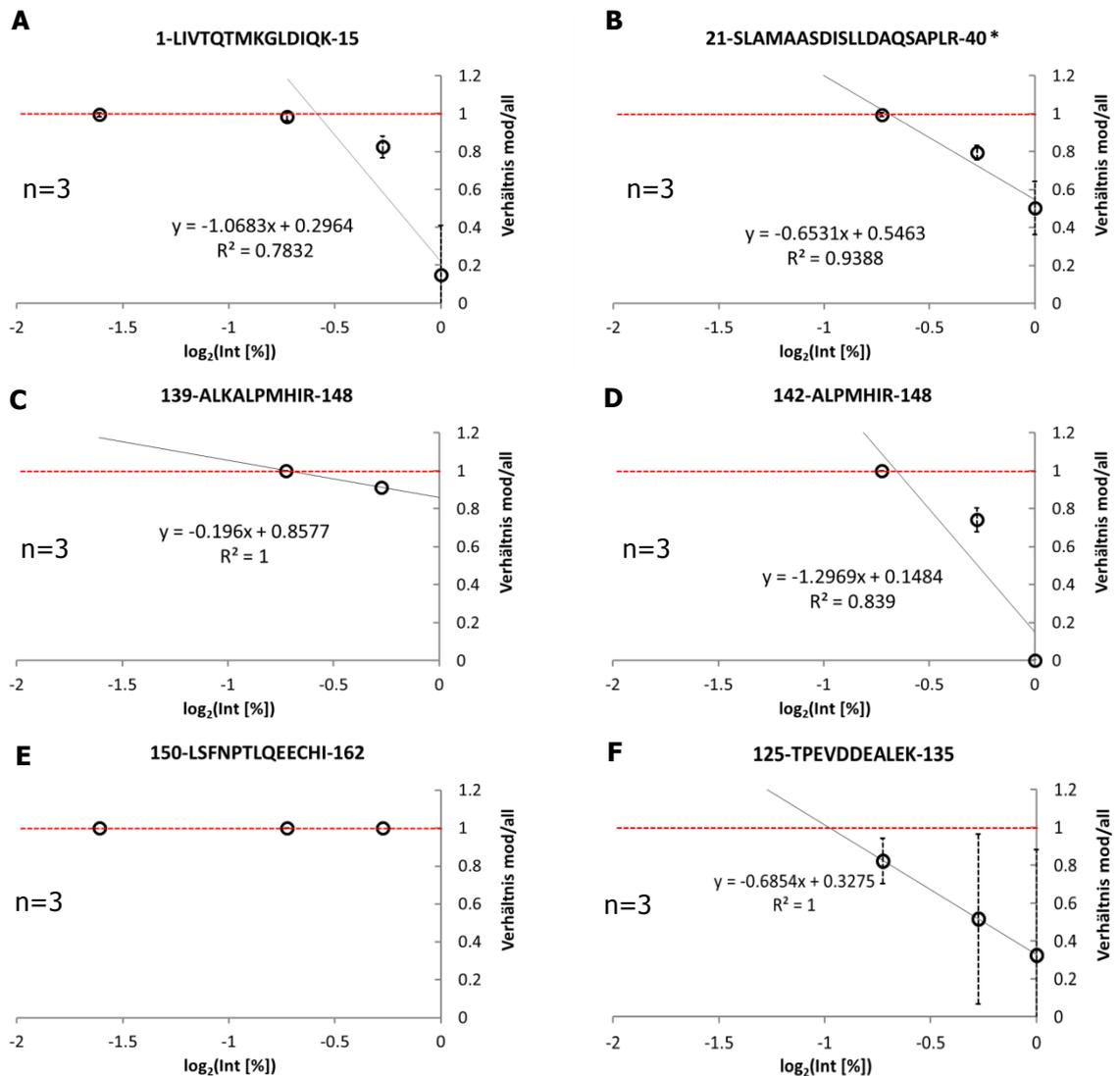


Abbildungen 10 : Intensität unmodifizierter Peptide, identifiziert und quantifiziert mittels MaxQuant.

4.6 Relative Quantifizierung der modifizierte Peptide und Identifikation der Oxidationsstelle

Die modifizierten Peptide wurden mit Hilfe der Proteom Discoverer Software quantifiziert. Alle Daten wurden auf die Gesamtintensität des zugegebenen, nicht bestrahlten Proteins bovine Ribonuklease normalisiert. Es wurde eine Sequenzabdeckung von 94,44 % erreicht. Insgesamt konnte der Verlauf von 8 modifizierten Peptiden relativ quantifiziert werden, welche wiederum 54,32 % der Sequenz von Beta-Laktoglobulin abdecken. Es wurden nur identifizierte Peptide berücksichtigt welche eine Massengenauigkeit < 5 ppm aufwiesen. Die Graphen sind in den Abbildungen 11 A-H dargestellt und enthalten auch Peptide, die nicht ausschließlich tryptische Spaltstellen aufweisen (Abbildung 11 B). Es konnten 3 methioninhaltige Peptide relativ quantifiziert werden. Peptide mit dem Methioninen 7 und 24 zeigen einen starken Anstieg bei fallender Alexa Fluoreszenz (Abbildungen A, C, D). Im Falle des Methionins 24 konnte nur ein semitryptisches Peptid identifiziert werden. Die Peptide -ALKALPMHIR-, welches das Methionin 145 enthält, sowie das C-terminale Peptid -LSFNPTLQEECHI- konnten zuerst nach der ersten Bestrahlung identifiziert werden. Letzteres in diesen Proben bereits nur als modifiziertes Peptid (Abbildung 11 C, E). Das Peptid -TPEVDEALEK- weist nach den ersten Bestrahlungen den größten beobachteten Fehler auf. Die Peptide welche Methionin 145 enthalten zeigte es bereits einen hohen Grad an Modifikation, welcher mit steigender Dosis schnell 100 % erreicht (Abbildung 11 C). Das Peptide -VLVLDTDYK- konnte nicht modifiziert

identifiziert werden. Die MS/MS-Spektren der als modifiziert erkannten Peptide wurden auf den typischen Massenshift von +16 Da einer Hydroxylgruppenaddition untersucht. Peptide die als modifiziert validiert wurden und ihre detektierten Modifikationsstellen sind in Tabelle 11 zusammengefasst.



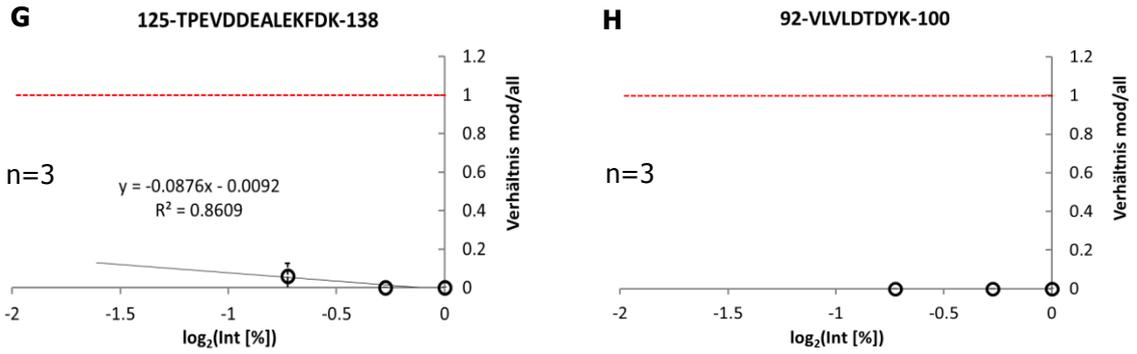


Abbildung 11: Verhältnis der Peakfläche modifizierter Spezies gegen die Gesamt-Peakfläche des Peptides, aufgetragen gegen den \log_2 der Verringerung der Intensität von Alexa 488.

* semitryptisches Peptid

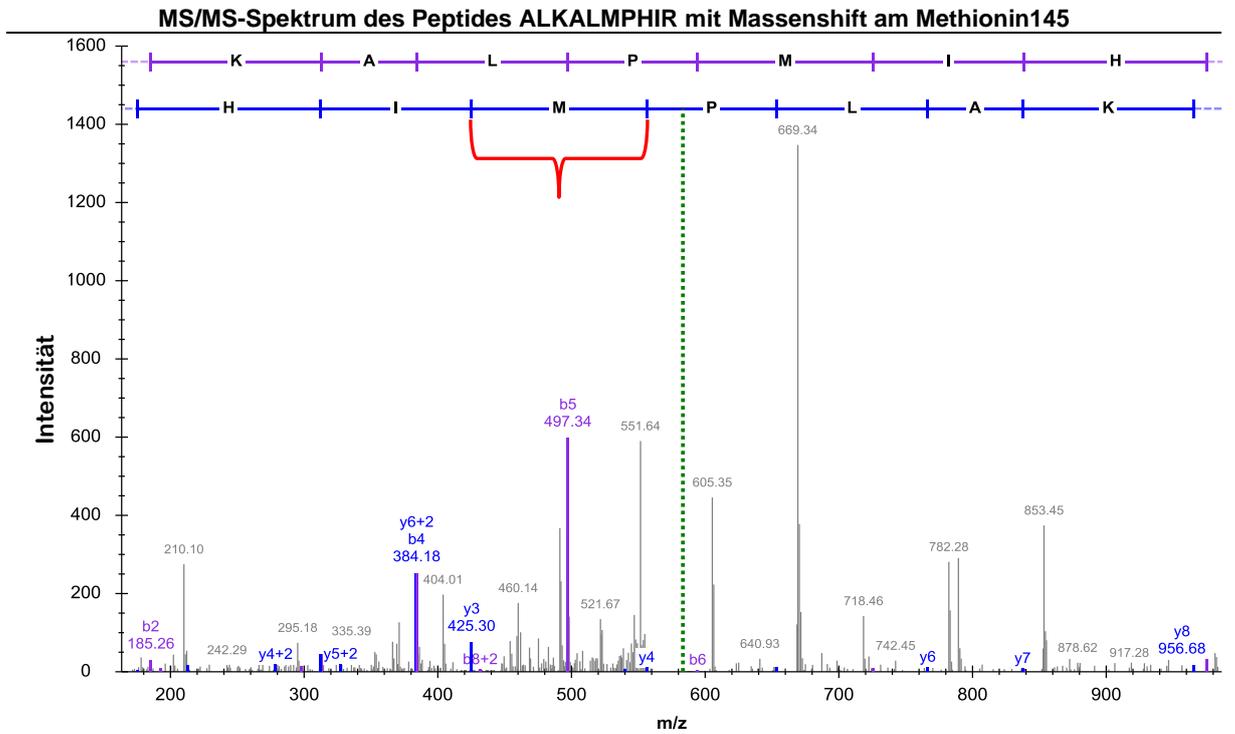


Abbildung 12: Identifizierter Massenshift am Methionin 145 in -ALKALPMHIR- bei 106 Gy.

Gefundene modifizierte Peptide und Modifikationsstellen mit XCorr

Position	Peptid	Masse [Da]	ΔM	Modifikationsstellen	XCorr (Score)
142-148	ALPMHIR	837,48	-0,1	M 145	1,8
				P 144	1,5
				H 146	1,5
139-148	ALKALPMHIR	1149,69	1,3	M 145	2,0
				I 147	1,9
				H 146	1,9
1-13	LIVTQTMKGLDIQK	933,54	0,1	M7	3,2
				T 6	2,8
				T 4	3,1
125-135	TPEVDDEALEK	1245,58	0,9	V 128	3,2
				K 135	3,0
				L 134	2,7
125-138	TPEVDDEALEKFDK	1635,76	1,0	L 133	3,4
				K 135	3,2
				V 128	3,2
21-40	SLAMAASDISLLDAQSAPLR*	2046,04	1,7	M 24	5,4
				L 29	5,1
				P 38	4,6
150-162	LSFNPTLQEECHI	1658,83	1,6	L 156, H 161	2,355
				L 149, I 162	2,313
				T 154, H 161	2,178

Tabelle 11: Identifizierte modifizierte Peptide mit wahrscheinlichen Oxidationsstellen und XCorr.

4.7 Crosslinking-Experimente mit dem Crosslinker EDC

Bei der Reaktion von Proteinen mit dem Crosslinker EDC können Amingruppen des Protein N-Terminus oder von Lysinen mit Carboxylgruppen von Asparagin, Glutaminsäure oder des Protein C-Terminus vernetzt werden, wenn sich diese funktionelle Gruppen auf Grund der Flexibilität der Proteinkonformation auf einen Abstand von unter 3 Å annähern können. Die maximalen C β -C β -Abstände zwischen den vernetzten Peptiden ergeben sich aus der Länge der verbundenen Seitenketten. Der maximale Abstand den die Seitenketten verbunden überbrücken können, beträgt bei einer Bindung zwischen Lysin und Asparagin 7,8 Da, bei Lysin und Glutaminsäure 8,7 Da.

4.6.1. Identifizierte Crosslinking Produkte

Die Spektren der möglichen vernetzten Peptide wurden genau auf Massenabweichungen geprüft und im Falle eines Sequenzabstandes von Null mit den Spektren des nicht vernetzten Peptides verglichen.

Für die Identifizierung von Crosslinking-Produkten wurden folgende Kriterien gesetzt:

- Massenabweichung zwischen experimentell bestimmter und theoretische Masse von unter 5 ppm
- Gute Korrelation zwischen experimentellen und theoretischen MS/MS-Spektrum
- Kein StavroX-Score unter 20 (zusätzliche manuelle Evaluierung)

Tabelle 12 zeigt alle Peptide die Anhand ihrer mittels MS bestimmten Masse des Vorläuferions sowie der MS/MS-Spektren (siehe Abb. 13) als mögliche vernetzte Peptide identifiziert wurden. Tabelle 13 zeigt alle möglichen Crosslinks. Mit Hilfe des Programms XWalk wurden für diese Crosslinks zusätzlich die Distanzen im PDB-Eintrag 1BSY sowie Informationen bzgl. der SAS ermittelt.

Mittels StavroX2.0.6 und Validierung der MS/MS-Spektren ausgewählte Crosslinking-Kandidaten

Peptid 1	Position	Peptid 2	Position	Score
Reaktionszeit 30 min				
[TKIPAVFK]	76-83	[IDALNENK]	84-91	60
Reaktionszeit 120 min				
[IIAEK]	71-75	[IDALNENK]	84-91	49
[IIAEK]	71-75	[TKIPAVFK]	76-83	46
[IIAEKTK]	71-77	[IDALNENK]	84-91	91
Nach beiden Reaktionszeiten identifiziert				
{LIVTQTMK}	0-8	[GLDIQK]	9-14	42
[VYVEELK]	41-47	[PTPEGDLEILLQK]	48-60	101
[KIIAEK]	70-75	[TPEVDDEALEK]	125-135	37
[IPAVFK]	78-83	[IDALNENK]	84-91	84
[IPAVFK]	78-83	[WENDEZAQKK]	61-70	24
[TPEVDDEALEK]	125-135	[FDK]	136-138	55
[TPEVDDEALEK]	125-135	[FDKALK]	136-141	63
[TPEVDDEALEKFDK]	125-138	[ALK]	139-141	63
[IIAEKTK]	71-77	[IPAVFK]	78-83	46

Tabelle 12: Alle mittels StavroX2.0.6 und Validierung der MS/MS-Spektren ausgewählten Crosslinking-Kandidaten.

Beispiel MS/MS-Spektrum mit möglichem Crosslink zwischen den Peptiden -IDALNENK- und -IIAEKTK- an den Positionen K91 und E74.

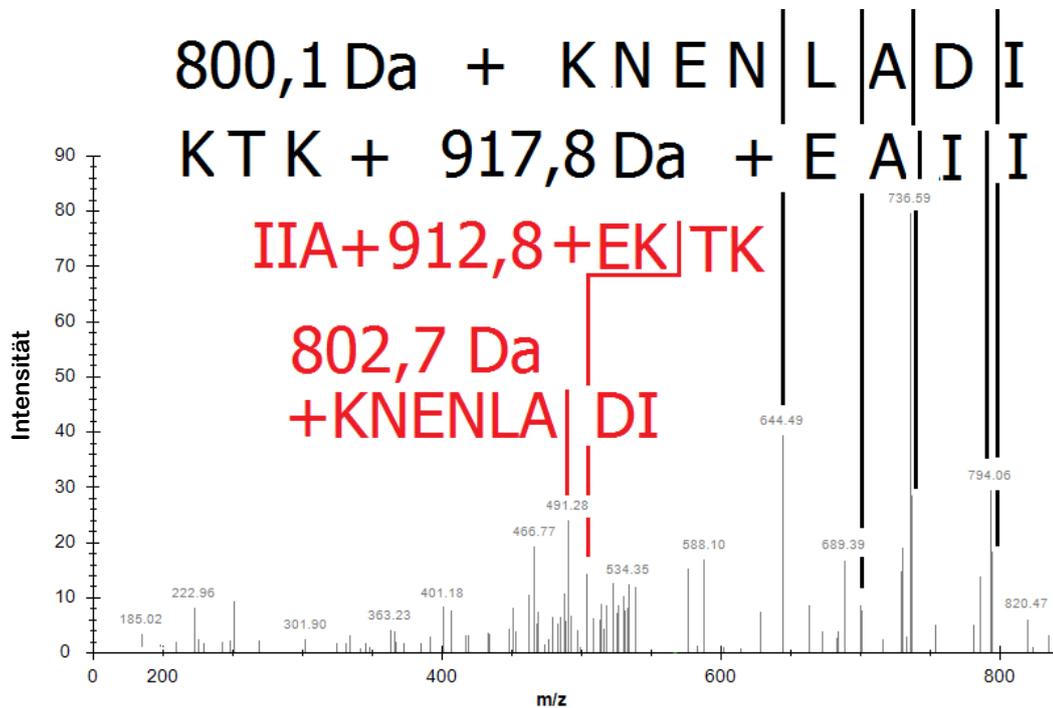


Abbildung 13: MS/MS-Spektrum mit identifizierten Massenabweichungen die zu einem Crosslinkereignis zwischen K91 und E74 passen. Rot markierte Peaks haben eine Ladung von 3+, schwarz markierte 2+.

Mittels XWalk ermittelte Abstände zwischen möglichen Reaktionspartnern für EDC						
1. Aminosäure	Position	2. Aminosäure	Position	Sequenzabstand	euklidischer Abstand	SAS Abstand
LYS	101	ASP	98	3	5.4	5.9
LYS	135	ASP	96	39	6.2	6.4
LYS	47	GLU	55	8	4	5.1
LYS	75	ASP	53	22	5.7	6.6
LYS	83	GLU	74	9	4.9	4.6
LYS	60	GLU	62	2	5.6	5.8
LYS	91	GLU	108	17	5.7	6.1
LYS	138	GLU	134	4	6.2	6.5
LYS	70	GLU	55	15	6.6	7.2
LYS	75	GLU	51	24	7.9	8.4
LYS	83	GLU	89	6	7.9	8.6
ASP	137	LYS	141	4	6.7	6.8
ASP	85	LYS	83	2	6.9	7.4
ASP	137	LYS	135	2	7.4	8.3

Tabelle 13: Alle Abstände für möglichen mittels tryptischer Spaltung erkennbarer, Crosslinks in Betalactoglobulin, der Treshold der Werte entspricht der maximalen Länge der verbundenen Seitenketten in idealer, planarer Konformation. Hervorgehobene Zeilen entsprechen Positionen in gefundenen Peptiden, kursive enthalten Positionen in nicht identifizierten Peptiden.

5 Diskussion

5.1 Energiedosis und Proteinsystem

Bei der Bestrahlung von Proteinen ist auf eine angemessene Energiedosis zu achten. Die stark sinkende Sequenzabdeckung und geringe Intensitäten im Massenspektrum deuten bei Energiedosen von 620 Gy bereits auf radiolytische Backbonebrüche und ungewöhnliche Oxidationsereignisse hin (Abbildung 9). Proteine mit einer hohen Anzahl an zugänglichen reaktiven Seitenketten sollten mit einer höheren Konzentration an Hydroxylradikalen behandelt werden um eine optimale Auflösung zu erzeugen. Der Fluoreszenz-Farbstoff Alexa 488 bindet Hydroxyl-Radikale und verliert dadurch seine Fluoreszenz [31]. Der Emissionsverlust steht in exponentiellem Zusammenhang mit der freien Hydroxylradikal Konzentration. Nach Chance et. al. sollte die Emission des Farbstoffes in den bestrahlten Proben auf circa ein Viertel der Ausgangsemission fallen [32]. Abbildung 4 zeigt dass dies bei purem Alexa bei einer Energiedosis von 780 Gy erreicht wird. Gelöste Proteinsysteme zeigen unterschiedliche Scavangereffekte die bei der Planung der Messreihe unbedingt beachtet werden müssen [33]. In Abbildung 5 ist zu sehen das Proteine wie Calmodulin, mit bis zu 10 reaktiven Methioninen, die Fluoreszenz um bis zu 30-40 % verringern können. Betalactoglobulin enthält 4 Methionine von denen eines vom Lösungsmittel abgeschirmt sein sollte. Die Sequenz von Calmodulin enthält 10 Methionine, welche wesentlich an der Abnahme von Hydroxyl-Radikalen in der Lösung beteiligt sein sollten. In Vorexperimenten sollte dieser Sachverhalt geprüft werden und für jedes Proteinsystem die geeigneten Bestrahlungsbedingungen optimiert werden. Es ist von Vorteil mit hohen Energiedosen zu beginnen und eventuell die Messreihen nach unten fortzusetzen. Die Anzahl an zugänglichen reaktiven Aminosäuren kann ein Anhaltspunkt für die Stärke des Scavengereffektes in der Probe sein. Allerdings ist die Vorhersage der SASA an hoch aufgelöste Strukturen gebunden, welche oft nicht verfügbar sind [34]. Die Messwerte legen nahe, dass für den verwendeten Beschleuniger Strahlendosen von 106 bis 1200 Gy ausreichende Mengen an Hydroxylradikalen erzeugen sollten, auch wenn in den bis-

herigen Experimenten nur Massenshifts von +16 Da beobachtet werden konnten.

5.2 Probenbegasung

Zur Begasung der Proben standen verschiedene Optionen zur Verfügung. Distickstoffmonoxid ist ein starkes Oxidationsmittel bzw. ein Sauerstoffüberträger und wurde als geeignete Atmosphäre in Betracht gezogen. Bekannte Reaktionen von Sauerstoffspezies während der Radiolyse von Wasser ließen einen positiven Einfluss von Sauerstoff auf Radikalbildung schließen (Tabelle 1). Es ist davon auszugehen dass Distickstoffmonoxid die gleichen Wechselwirkungen mit der flüssig Phase eingeht wie molekularer Sauerstoff. Die Zusammensetzung der Atmosphärenluft liegt im trockenen Zustand bei 78,08 % Stickstoff, 20,95 % Sauerstoff und 0,97 % anderen Gasen [35]. Die Löslichkeit von molekularem Stickstoff liegt bei 25°C und einer Atmosphäre bei circa 17 mg/L, die von Sauerstoff bei 40 mg/L [36]. Die Effektivität der Radiolyse in Atmosphären Luft sollte damit durch einen geringeren Anteil an Oxidationsmittel in der Flüssigphase sinken. Rückschlüsse auf den Einfluss der Atmosphäre zur gesamt Effizienz sollten erkennbar sein. Abbildung 6 zeigt klar einen quantitativen Unterschied zwischen dem gemessenen Ionenstrom bei jeder Bestrahlungszeit. Im Durchschnitt unterscheiden sich die gemessenen Intensitäten bei reaktiven Peptiden um ca. 10%. Die Quer- und Rückreaktionen bei der Radiolyse sind noch nicht vollkommen erforscht. Takahashi et. al veröffentlichten 2004 einen Letter in dem sie Überlegungen zu der Wirkung von N_2O als e_{aq}^- Scavenger anstellten und experimentell überprüften dass die Reaktionsgeschwindigkeit von N_2O bei einer Bestrahlung leicht unter der molekularem Sauerstoffs liegt (N_2O : $9,36 \cdot 10^9 M^{-1}s^{-1}$ O_2 : $1,9 \cdot 10^{10} M^{-1}s^{-1}$) (23, 37). Das primär bei der Radiolyse entstehende hydratisierte Elektron reagiert mit molekularem Sauerstoff, über das reaktive Superoxidation-Radikal als Mediat, schnell zu Hydroxyl-Radikalen (mit e_{aq}^-), Sauerstoff (Hydroxyl-Radikal, Oxidation Radikal) und oder Hydroperoxy-Radikal (Wasserstoffperoxid) ab [38, 39]. Distickstoffmonoxid reagiert mit e_{aq}^- über ein Sauerstoffanion zu Hydroxylradikalen. Der Vorgang ist allerdings weniger gut

aufgeklärt als die Reaktionen mit Sauerstoff. Die Ergebnisse legen nahe das das unter anaeroben Bedingungen gebildete Sauerstoffanion eine schneller Reaktionskinetik und höhere Umsetzung zu Hydroxyl-Radikalen erfährt als das Superoxidation welches unter anderem mit Sauerstoff zu Hydroxidionen reagiert (siehe Tabelle 1) [40]. Die komplexen Reaktionen bei der Radiolyse von Wasser ist geprägt durch ein Pseudogleichgewicht von Ketten-, Quer- und Rückreaktionen auf welches der Scavenger-Effekt von Soluten einen nicht proportionalen Einfluss hat [41, 42]. Die vorliegenden Daten belegen nicht klar einen absoluten Vorteil einer Distickstoffmonoxid Atmosphäre über eine Sauerstoffatmosphäre. Für die durchgeführten Experimente scheint sie allerdings einen beobachtbaren Vorteil bei der Erzeugung von Hydroxylradikalen zu haben (Abbildung 7).

5.3 Sequenzabdeckung und Intensität

In allen Experimenten konnten 69,1-100 % der Sequenz von Betalactoglobulin abgedeckt werden. Diese Sequenzabdeckung könnte durch den Einsatz weiterer Peptidasen beim Verdau noch weiter gesteigert werden.

Eine Herausforderung für gängige Suchalgorithmen ist das Auftreten von vielen verschiedenen Modifikation sowie unspezifischen Backbone Brüchen [43]. Es ist mit den vorhandenen Datenbank Suchalgorithmen nicht möglich den gesamten Suchraum, mit allen möglichen Permutationen, mit einer hinreichenden False Discovery Rate (FDR) zu analysieren. Die Anzahl an möglichen Permutationen ergibt sich aus den 14 reaktiven Aminosäuren und den 11 auftretenden Modifikationen über die Länge der Aminosäure Sequenz. Über eine Sequenzlänge von 162 Aminosäuren ergab sich bei Betalactoglobulin eine Anzahl von rund $3,95 \cdot 10^{16}$ möglichen Oxidationsmustern, aufgeteilt auf Peptide durch 18 Trypsin Spaltstellen. Deshalb wurden für diese Analyse alle Suchen zur Bestimmung der Sequenzabdeckung zunächst ohne Berücksichtigung dynamischer Modifikationen durchgeführt. Die generelle Sequenzabdeckung sinkt mit steigender Strahlungs dosis und deutet auf Oxidationsereignisse hin, die es dem Suchalgorithmus so nicht mehr erlauben die Peptide zu identifizieren. Eine Ver-

ringerung der Anzahl identifizierter, unmodifizierter Peptide mit steigender Strahlendosis ist das zu erwartende Resultat. Einige Peptide konnten allerdings erst nach der ersten Bestrahlung mit MS identifiziert werden. Die Sequenzabdeckung war zum Teil in bestrahlten Proben geringerer Dosis höher als in den korrespondierenden Kontrollen (Tabelle 10). Eine Steigerung der Effektivität der tryptischen Proteolyse nach Proteinbestrahlungen wird schon seit langem beobachtet und könnte in Zusammenhang mit unspezifischen Spaltungen stehen [44]. In direkten Suchen gegen eine kleine Datenbank, die lediglich die Sequenz des Probenmolekül anstatt aller humaner Proteine enthielt, konnte die Abdeckung deutlich verbessert und die Suchgeschwindigkeit erhöht werden. Um falsche Identifizierung zu vermeiden wurde eine FDR-Bestimmung durchgeführt und nur Peptidtreffer mit einer $FDR < 5\%$ berücksichtigt. Sharp et al. [45] konnten in ihren Experimenten Betalactoglobulin bei einer Bestrahlung von 260 Gy über 480 ns eine Sequenzabdeckung von 100% erreichen. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit verifizierten Sharp et al. alle Spektren von Hand, dementsprechend wurde keine FDR angegeben. Ein direkter Vergleich ist daher nur bedingt möglich. Um verifizierbare, reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse zu erzielen ist die Nutzung einer Datenbanksuche mit wohldefinierten Parametern zu empfehlen. Im Sequenzplot ist erkennbar dass auch die Intensitäten der einzelnen Peptide über die Energiedosis stark abfällt (Abbildung 9). Methioninhaltige Peptide sind früh nicht mehr identifizierbar. Der Sequenzabschnitt 10-40 ist bereits in der Kontrolle nicht zu identifizieren und bildet einen blinden Fleck. Es konnte nur ein um 6 Aminosäuren kürzeres semitryptisches Proteaseprodukt des Peptides 15-VAGTSLAMAASDISLLDAQSAPLR-40 identifiziert werden. Das Peptid 101-KYLLFCMENSAEQLUCQCLVR-124 konnten nur in den unbestrahlten Kontrollen identifiziert werden. Dieser Sequenzabschnitt enthält viele reaktive Aminosäuren mit jeweils hoher Lösungsmittelzugänglichkeit und könnte ein Angriffspunkt für ungewöhnliche Oxidationsereignisse sein. Bei beiden Peptiden ist aufgrund ihrer Länge und der enthaltenen Aminosäuren eher von einer Menge an Modifikationen auszugehen die sie aus dem erfassbaren Ereignisraum drängen, als von einem grundlegenden Problem bei der Detektion

im MS. Die Massen der Peptide 61-WENDECAQKK-70 und 101-KYLLFCMENSAEPEQSLVCQ-124 konnten in keiner Probe gemessen werden.

5.4 Verlust unmodifizierter Peptide

Methionine und Cysteine stellen dank ihrer Schwefelgruppe die reaktivsten Gruppen in Zusammenhang mit Hydroxyl-Radikalen dar. Dies erklärt den beinahe doppelt so starken Intensitätsverlust der methioninhaltigen Peptide. Das einzige cysteinhaltige Peptid –LSFNPTQLEEQCHI- zeigt zwar sinkende Intensitäten allerdings keinen vergleichbaren Verlust zu den methioninhaltigen Peptiden. Am Peptid -TPEVDDEALEK- lassen sich die Modifikationsstellen gut nachvollziehen. Eine Veränderung der Intensität lässt sich erst am Peptid –TPEVDDEALEKFDKALK- erkennen. Die Hauptoxidationsstellen dieser Peptidgruppe müssen sich in den Aminosäuren 125-135 und 139-141 befinden. Neben dem MS/MS-Spektrum stellt dies eine weitere Verifizierung der Modifikationsstellen L134 und K135 dar. Diese Oxidation trägt ein Drittel zum Intensitätsverlust des Peptides -TPEVDDEALEKFDKALK- bei. Die n-terminalen Peptide lassen sich ähnlich aufschlüsseln und zeigen dass die wesentlichen Modifikationsstellen sich im Peptidabschnitt 1-8 befinden müssen. Das Methionin 7 ist hier als reaktivste Aminosäure zu favorisieren. Das Verhalten aller Peptide zeigt dass die Annahme eines lineareren Zusammenhangs zwischen Dosis und Intensität gerechtfertigt ist. Im Peptid -VLVLDTDYK(K)- konnten über die MS/MS Spektren keine Modifikation festgestellt werden, das Verhalten zeigt allerdings klar dass eine sich über die Bestrahlungsintensität steigernden Intensitätsverlust eine Modifikation bedingt. Diese deckt sich trotz der fehlenden Identifizierung in den Datenbanksuchen mit der von Sharp et. al. identifizierten Oxidation an Tyrosin 99.

5.5 Identifizierte Modifikationen und Dynamik oxidierter Peptide

Der Großteil der identifizierten Modifikationsstellen stellen gleichzeitig die am besten vom Lösungsmittel zu erreichenden Vertreter ihrer Spezies dar, oder sind zumindest moderat dem Lösungsmittel zugänglich. Von den 16 identifizierten Modifikationsstellen decken sich nur 5 mit den von Sharp et al. veröffentlichten. Was Zweifel an der Methode der Datenbank gestützten Spektrenanalyse im Vergleich zur Verifizierung durch einen Wissenschaftler aufruft. Die identifizierten Modifikationen befinden sich allerdings zu großen Teilen innerhalb der gleichen tryptischen Peptide und sind sequenziell sehr nah.

Die von Sharp et al. publizierte Genauigkeit konnte nicht erreicht werden. Die Verhältnisse wurden über die Verringerung der Fluoreszenz im \log_2 aufgetragen um eine bessere Regression zu ermöglichen. Durch diese Vorgehensweise korrelieren die Geraden näher an die tatsächliche, unbekannte Hydroxylradikalkonzentration. Die erhaltenen Gleichungen decken sich im Verhalten mit den Erwartungen und zeigen ein stark zunehmendes Oxidationsverhältnis bei steigender Energiedosis. Bei alle Peptiden die über die Messreihe ein steigendes Verhältnis aufzeigen konnte bereits ein Intensitätsverlust der unmodifizierten Peptide festgestellt werden. Das C-terminale Peptid 140–LSFNPTLQEECHI-162 ist bereits nach einer Bestrahlung von 106 Gy durch den Sequestalalgorithmus nicht mehr unmodifiziert identifizierbar. Die Label freie Quantifizierung von Max Quant war im selben Experiment in der Lage die Intensitäten des unmodifizierten Peptides in allen Proben zu identifizieren.

Wie in der Arbeit von Sharp et. al. war es auch in dieser Arbeit nach abschließender Betrachtung nicht möglich das Methionin 107 oxidiert zu identifizieren oder über die Messreihe bei den verschiedenen Strahlendosen zu charakterisieren. M 107 kann nur in einem 12 AS langem Peptid identifiziert werden. Seine hohe SASA und die der AS in seiner Nähe machen es wahrscheinlich das Oxidationsereignisse stattfanden die nicht beobachtet werden konnten. Auch durch die Betrachtung weiterer semitryptischer Peptide konnten keine neuen Informationen gewonnen werden. Die Oxidation des Methionin 24, trotz seiner Position

im inneren der Struktur, die in beiden Arbeiten beobachtet werden konnte, deutet auf ein nicht zufälliges Ereignis hin. Der kurze Zeitraum zwischen Bestrahlung und dem stoppen der Reaktionen durch TRIS-HCL könnte ausgereicht haben um zu sekundären Oxidationen zu führen wie sie an Methioninen beobachtet werden können [46]. Dieser Annahme widerspricht die Tatsache dass in keiner der Arbeiten Cysteine modifiziert wurden. Die Seitenkette von M 107 befindet sich auf der Innenseite des Beta-Barrels in welchem Betalactoglobulin kleinere Fettsäuren bindet und würde bei der Untersuchung dieser Komplexe wertvolle Informationen liefern.

Von 4 Methioninen konnten im Experiment nur 2 in tryptischen Peptiden beobachtet werden. Im Peptid 15-VAGTVYSLAMAASDISLLDAQSAPLR-40 treten nachweislich Modifikationen an Methionin 24 auf, welches im Model 1BSY keine Lösungsmittelzugänglichkeit besitzen ($SASA=0$). Das Peptid 21-SLAMAASDISLLDAQSAPLR-40 wurde auch von Sharp et al. in Ermangelung des tryptischen Peptides zur relativen Quantifizierung verwendet. Das Peptid konnte bereits in den Kontrollen oxidiert nachgewiesen werden. Auch Sharp et al. konnten diese Modifikation trotz der geringen Lösungsmittelzugänglichkeit in ihren Experimenten beobachten. Sharp et al. erreichte dabei ein Verhältnis von 0,1184, das erreichte Verhältnis in dieser Arbeit lag bereits bei der Kontrolle bei 0,56, der entsprechende Fehler bei 0,14. In der Arbeit von Sharp et al. findet die Anzahl der Replikate keine Erwähnung. Es ist leider nicht möglich abzuschätzen ob eine höhere Anzahl den Fehler minimieren würde. Zwar wird das Methionin hauptsächlich von Loop-Regionen abgeschirmt doch haben diese vergleichbar niedrige b-Faktoren. Bei genauer Analyse der Struktur von 1BSY fällt ein in der Struktur eingeschlossenes Wassermolekül auf (Abbildung 15). Dieses hat einen Abstand von weit weniger als einem Da und kann als die Ursache der Oxidation an Methionin 24 gesehen werden. Es ist möglich dass die zugeführte Energie auch ein isoliertes Wassermolekül spaltet und ein Radikal mit der Seitenkette reagieren kann.

In der Struktur von 1BSY eingeschlossenes Wassermolekül nahe Methionin 24

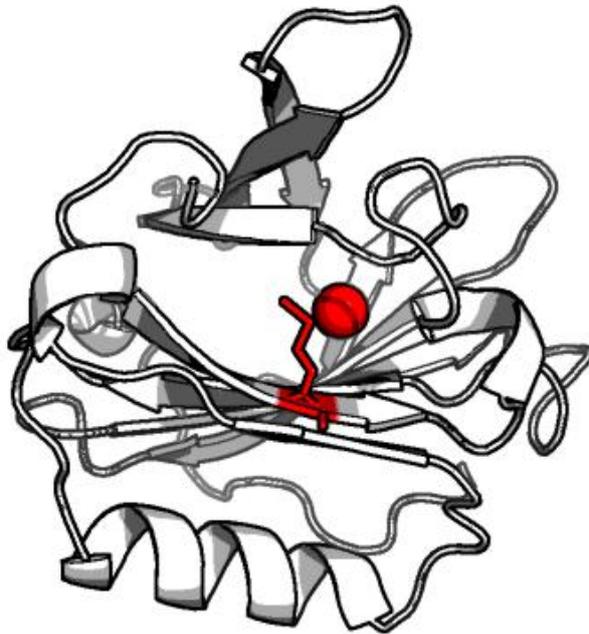


Abbildung 14: In die Struktur von 1BSY eingelagertes Wassermolekül als mögliche Ursache für die Oxidation von Methionin 24

Alle aus dem Experiment erhaltenen Daten sind in Abbildung 16 dargestellt. Mittels aller beobachtbaren Oxidationsereignisse sind wir in der Lage 42,0 % der Sequenz des Proteins zu überblicken. Dies entspricht 47,7 % der Oberfläche von Betalactoglobulin. In Abbildung 17 sind dieselben Informationen in der Struktur von Betalactoglobulin gezeigt. Die b-Faktoren geben Auskunft über variable Oberflächenbereiche. Die Grafik zeigt den klaren Zusammenhang zwischen Lösungsmittelzugänglichkeit und Oxidationserfolg.

Sequenzabdeckung, Dynamiken der Peptide und identifizierte Modifikationsstellen in der Sequenz von Betalactoglobulin

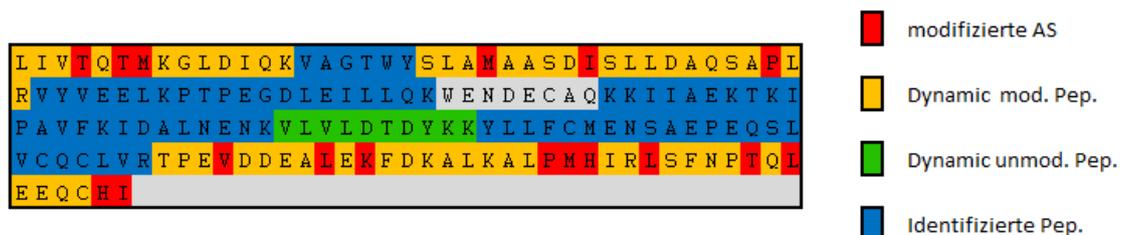


Abbildung 15: Zusammenfassung der erhaltenen Informationen aus den Bestrahlungsexperimenten.

Sequenzabdeckung, Dynamiken der Peptide und identifizierte Modifikationsstellen in der Struktur von Betalactoglobulin

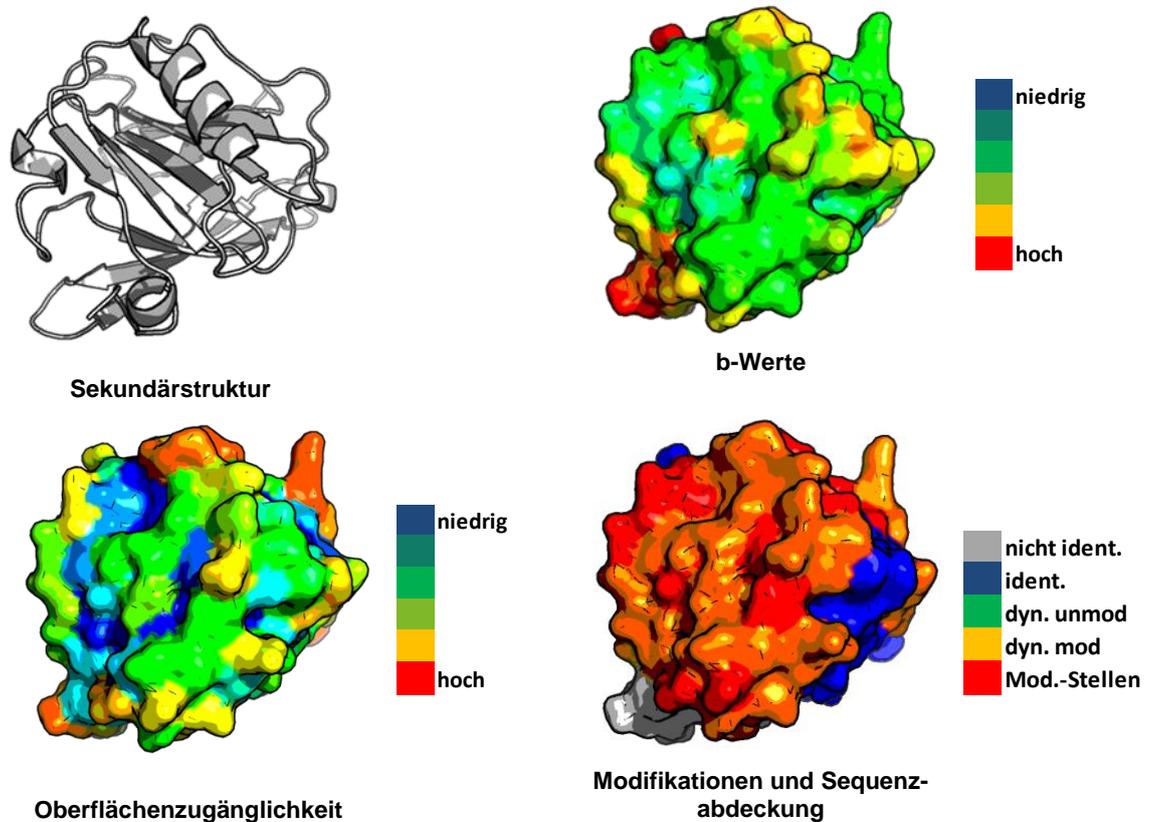


Abbildung 17: Zusammenfassung der erhaltenen Informationen aus den Bestrahlungsexperimenten in der Struktur von 1BSY.

4.6.2 Evaluierung der gefundenen Cross-Links

Da sich gerade in Loop-Bereichen die Konformation der Backbone dynamisch ist bzw. in vielen Formen vorliegen kann wurde die Strukturen von 7 Sequenzanalogen und 13 Strukturanalogen auf ihre Abstände untersucht. Das Strukturalignment von 1BSY und 1CJ5, der Strukturen mit den größten Abweichung zu 1BSY (94% Identität, Z-Wert 16,5) welche noch eine identische Sequenzlänge zu 1BSY aufweist ist in Abbildung 17 dargestellt.

Sequenzalignment von 1BSY und 1CJ5

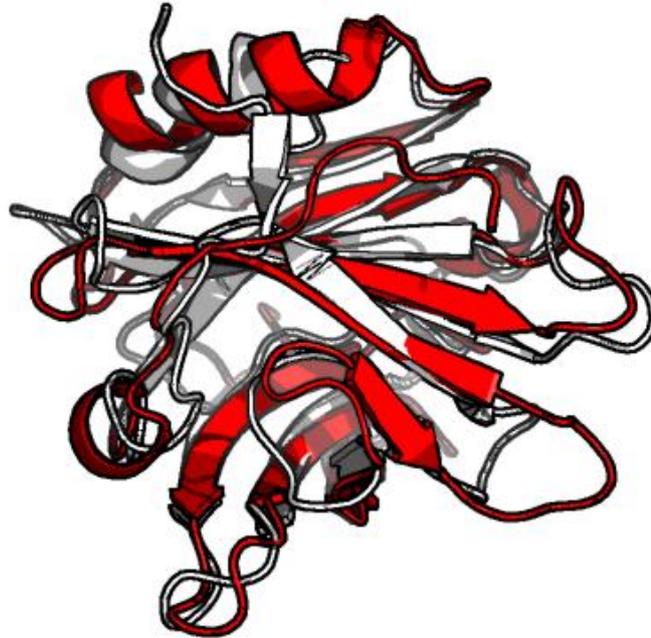


Abbildung 17: Sequenzalignment mittels Pymol von 1BSY (rot) und 1CJ5 (weiß).

Ausgehend von diesen Strukturen wurden die Distanzen der gefundenen Cross-links in den PDB-Strukturen 1BSY, 1BSO, 2BLG, 3BLG, 3NQ3, 3UEX, 3PH5, 3UEW, 1GX8, 1GX9, 3NPO, 1B00, 4DQ3, 4DQ4, 3QZJ, 3QZK, 1GXA, 1BSQ, 1BEB und 2R56 ermittelt, sowie zusätzliche mögliche Distanzen bestimmt. Das Struktur Alignment wurde mit Dali Lite durchgeführt [47], Strukturen wurden in Betracht gezogen wenn die die Sequenzlänge 162 hatten und keinen Z-Wert unter 15. Zur Bestimmung sequenzähnlicher Proteinannotationen wurde Blast und die Blossum80 Substitutionsmatrize verwendet.

Gefundene mittels EDC vernetzte Peptide						
errechnete Masse	gemessene Masse	Abw.	Petid1	Peptid 2	AS1	AS2
Reaktionszeit: 30 min						
1571.8799	1571.8792	0.5 ppm	[IPAVFK]	[IDALNENK]	Lys 83	Glu 89
1571.8799	1571.8792	0.5 ppm	[IPAVFK]	[IDALNENK]	Lys 83	Asp 85
2313,2589	2313,2588	0,0 ppm	[VYVEELK]	[PTPEGDLEILLQK]	Lys 47	Glu 55
1947,9878	1947,9910	-1,6 ppm	[TPEVDDEALEK]	[FDKALK]	Lys 138	Glu 134
Reaktionszeit 120 min						
1457.9094	1457.909	0.3 ppm	[IIAEK]	[TKIPAVFK]	Lys 83	Glu 74
1457.9094	1457.909	0.3 ppm	[IIAEKTK]	[IPAVFK]	Lys 83	Glu 74
1457.9094	1457.909	0.3 ppm	[IIAEK]	[TKIPAVFK]	Lys 77	Glu 74

Tabelle 14: mittels StavroX2.0.6 identifizierte vernetzte Peptide von Betalactoglobulin.

* Peptide deren Abstand nur in anderen Strukturen von Betalactoglobulin validiert werden konnte.

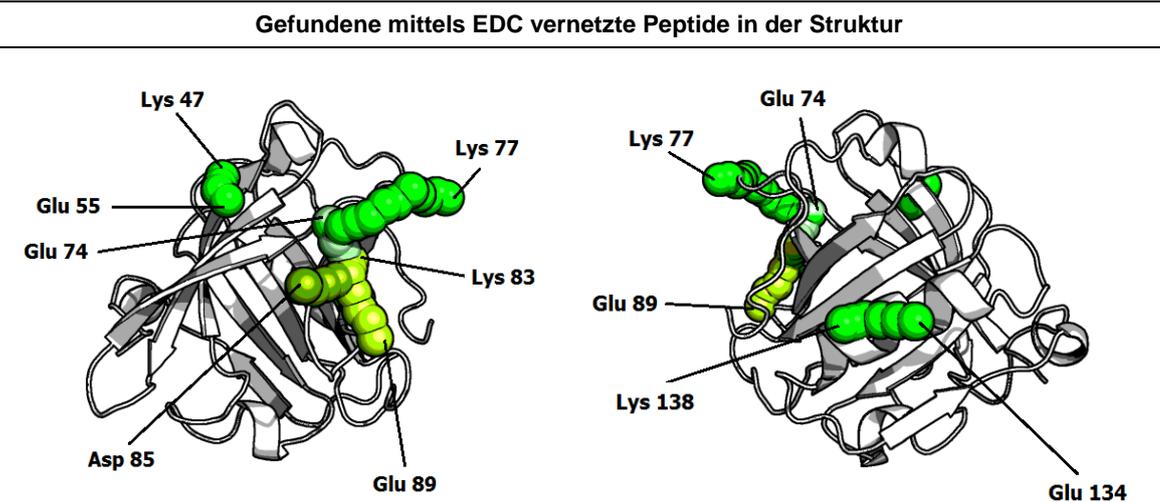


Abbildung 18: Gefundene Crosslinks in 1BSY.

Durch das Crosslinking Experiment sollte geprüft werden ob sich durch eine weitere Methode der MS-basierten Strukturaufklärung Daten erzeugen lassen welche die bisherigen Erhebungen unterstützen. Es konnten 5 vernetzte Peptide identifiziert werden sowie 2 mögliche Crosslinks zu Di- oder Oligomeren. Von den 14 möglichen Crosslinks wurden zwar nur wenige identifiziert diese liegen aber gerade in den für die Transitionen bedeutenden Regionen. Während die Abstände zwischen den AS K 138- E 134 und k 47-E 55 direkt in Sekundärstrukturen liegen, liefern die verbliebenen Crosslinks Informationen über variable

Loopbereiche. Die Peptide K 138- E 134 und k 47-E 55 eignen sich um eine Mindestlänge der Helix und des c-terminal ausgerichteten Beta-Faltblattes II zu bestimmen. Die verbliebenen Crosslinks liegen in oder verbinden den EF und den GH-loop. In pH korrelierten Studien ließe sich die Schließung des EF-loops bei Transitionen im niedrigen pH-Wert-Bereich untersuchen. Dazu müsste allerdings das Zeitproblem das sich aus der geringen Stabilität der Crosslinkingreagenzien bei der Arbeit mit EDC im sauren Bereich ergibt beachtet werden. Ein Vergleich zur Betalactoglobulin Variante B welche im neutralen Bereich einen geschlossenen EF-Loop aufweist wäre sehr aufschlussreich. Mit Ausnahme des Crosslinks K138-E 134 befinden sich die identifizierten Crosslinks in Bereichen in welchen nur wenige Reaktionen mit Hydroxyl-Radikalen beobachtet werden konnten. Die AS welche reagierten wiesen eine durchschnittliche SASA von circa 80 auf, das Minimum war E 55 mit 39,8. Die niedrigen Geschwindigkeitskonstanten von Glutaminsäure, Asparginsäure und Lysin mit Hydroxyl-Radikalen ermöglichten eine höhere Abdeckung in diesen Bereichen durch die Benutzung von EDC. Zwischen den Peptiden 70 -75 und 125 – 135 wurden MS/MS Spektren gemessen die eine Vernetzung nahe legten. Die Peptide sind an gegensätzlichen Seiten des Proteins gelegen und könnten Hinweise auf die Bildung des asymmetrischen Dimers sein. Die Kooperation beider Methoden gibt hier die Möglichkeit diese Hypothese zu verwerfen da das Peptid 125-135 (-TPEVDDEALK-) eindeutig als oxidiert und damit als nicht durch ein potentielles Dimer vom Lösungsmittel abgeschirmt identifiziert wurde. Der Crosslink konnte mittels Hydroxyl-Radikal Footprinting als Falsch Positiv identifiziert werden. Der zweite Kandidat für einen Crosslink zwischen zwei Betalactoglobulin Proteinen ist zwischen den Peptiden 78-83 und 61-70. Beides sind Bereiche die der Aufklärung durch Radikal Probing Probleme bereiteten. –WENDECAQKK- konnte in einer Datenbanksuche bisher nicht identifiziert werden und –IPAVFK- konnte bei der manuellen Sichtung des Spektrums nur ohne Massenabweichung erkannt werden. Beide Peptide tauchen auch bei Sharp et al. nicht modifiziert auf.

6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es die Methode des Hydroxylradikal Protein Footprintings am Helmholtzzentrum für Umweltforschung – UFZ zu etablieren und auf die Untersuchung des Modellproteins Betalactoglobulin anzuwenden.

Wichtige Parameter für den Erfolg eines Hydroxylradikal Proteinfootprinting Experiments, wie die u.a. die Bestrahlungsintensität und die Pulslänge, die Probenbegasung sowie die Messung mittels LC-MS und die Datenauswertung konnten hinreichend charakterisiert und optimiert werden. Dazu wurde zunächst die relativen Mengen oxidativer Spezies in den bestrahlten Proben über die Verringerung der Fluoreszenz des Farbstoffes Alexa 488 ermittelt. Über diese Daten ließ sich der Intensitätsbereich, in dem eine Proteinbestrahlung für optimale Ergebnisse stattfinden sollte, abstecken (Vermeidung von Backbonebrüchen und sekundären Oxidationen bei zu hohen Energiedosen).

Die Betrachtung der Alexa Fluoreszenz nach Bestrahlungen verschiedener Proteinsysteme zeigte eine eindeutige Abhängigkeit der Fluoreszenz vom bestrahlten Protein. Hydroxylradikale können bei intakter Konformation nur mit Aminosäuren der Proteinoberfläche reagieren. Eine große Anzahl und gute Zugänglichkeit dieser Seitenketten korreliert mit sinkenden Fluoreszenzwerten und unterscheidet sich bei verschiedenen Proteinsystemen stark. Dies zeigte klar, dass die Energiedosen für jedes Proteinsystem unabhängig bestimmt werden müssen, um ausreichend Oberflächeninformationen zu generieren.

Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die Probenbegasung einen signifikanten Einfluss auf die Oxidationseffizienz hat und eine Begasung mit N_2O der mit molekularem Sauerstoff vorzuziehen ist.

Im Einzelnen war es möglich, das Oxidationsverhalten von 10 Peptiden über 4 verschiedene Energiedosen zu beobachten, bei 7 dieser Peptide war eine relative Quantifizierung möglich. Die Ergebnisse wurden mit einem vergleichbaren Experiment der Arbeitsgruppe Sharp et al. verglichen. In dieser Arbeit waren wir in der Lage, 16 Modifikationsstellen zu bestimmen. 5 davon decken sich mit

den Ergebnissen von Sharp et al., welcher insgesamt 14 Modifikationsstellen beschrieb. Nahezu alle identifizierten Modifikationen sind dem Lösungsmittel gut zugänglich. Einzig Methionin 24 wird trotz minimaler Lösungsmittelzugänglichkeit oxidiert. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Beobachtung von Sharp et al., welcher das Methionin ebenfalls als modifiziert beschrieb. Das in unmittelbarer Nähe in die Struktur eingeschlossene Wassermolekül ist ein wahrscheinlicher Grund für die Oxidation von Methionin 24.

Durch weiterführende Crosslinking Experimente waren wir in der Lage, Distanzdaten über den variablen Loop-Bereich der Tanford Transition von Betalactoglobulin zu erhalten. 3 von 5 der vernetzten Peptide befinden sich in diesem für die Ligandenbindung wichtigen Bereich. Durch die Crosslinks waren wir in der Lage genau die Bereiche abzudecken, die sich nicht mittels Hydroxylradikal Proteinfootprinting beobachten ließen.

Die Kooperation beider Methoden ermöglichte es uns auf Sequenzebene 66,6 % der Aminosäuren auf ihre Reaktivität mit dem Lösungsmittel zu beobachten. Dies resultiert in einer Oberflächenabdeckung von 71,52%.

In Anbetracht dieser positiven Ergebnisse steht das Hydroxylradikal Footprinting, wahlweise in Kooperation mit chemischem Crosslinking, als Methode zur Oberflächenaufklärung von Proteinen und Proteinkomplexen zur Verfügung. Weitere Experimente werden sich mit der Aufklärung von Bindungsflächen in Proteinkomplexen beschäftigen. Das methioninhaltige Kalzium bindende Protein Calmodulin nimmt physiologisch viele Konformationen ein. Diese werden wesentlich von seinem Bindungspartner mitbestimmt. Der Calmodulin-Melittin Komplex, von dem keine hochaufgelösten Strukturen, sondern lediglich mehrere Modelle existieren, wäre ein gutes Modell, um die Methode in einer tatsächlich aufklärenden Studie zu validieren. Final soll die Methode am UFZ angewandt werden, um Interaktionsflächen in hochmolekularen Protein/Protein- und Protein/RNA-Komplexen zu untersuchen.

Quellen

1. Carugo O, Argos P. Protein-protein crystal-packing contacts. *Protein Science. Protein Sci.* 1997 Okt;6(10):2261-3.
2. Glaeser R. Review: Electron Crystallography: Present Excitement, a nod to the past, anticpain the future. *J Struct Biol.* 1999 Dez;128(1):3-14.
3. Brasch RC. Work in progress: methods of contrast enhancement for NMR imaging and potential applications. A subject review. *Radiology.* 1983 Jun;147(3):781-8.
5. Insil K, Lukavsky PJ, Puglisi JD. NMR study of 100 kDa HCV IRES RNA using segmental isotope labeling. *J Am Chem Soc.* 2002 Aug 14;124(32):9338-9
6. Wider G, Wüthrich K. NMR spectroscopy of large molecules and multimolecular assemblies in solution. *Curr Opin Struct Biol.* 1999 Okt;9(5):594-601.
7. Rossi P, Swapna GVT, Huang YJ, Aramini JM, Anklin C, Conover C, Hamilton K, Xiao R, Acton TB, Ertekin A, Everett JK, Montelione GT. A microscale protein NMR sample screening pipeline. *J Biomol NMR.* 2010 Jan;46(1):11-22.
8. Vassilyev D, Miyazawa A, Kidera A, Matsushima M, Mitsuoka K, Murata K, Hirai T, Fujiyoshi Y. Surface of bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography. 1997 Sep 11;389(6647):206-11
9. Walza T. Electron Crystallography of Two-Dimensional Crystals of Membrane Proteins. *Journal of Structural Biology.* 1998;121:142-61.
10. Modbase Statistics and Genome Datasets: modbase@salilab.org.
URL: <<http://modbase.compbio.ucsf.edu/modbasecgi/display.cgi?server=modbase&type=statistics>>, 2012 Sep.
11. Esther WM. Using Chemical Crosslinking and Mass Spectrometry for Protein Model Validation and Fold Recognition. Waterloo, Universität von Waterloo, Biology, Masterarbeit. 2006.
12. Walker JM (Ed.). *The Proteomics Protocols Handbook.* Madhusudhan MS, Marti-Renom MA, Eswar N, Bino J, Pieper U, Karchin R, Shen MY, Sali A. Comparative Protein Structure Modeling. 2005, Kapitel XVIII:988-94.
13. Guan JQ, Chance MR. Structural proteomics of macromolecular assemblies using oxidative footprinting and mass spectrometry. *Trends Biochem Sci.* 2005 Oct;30(10):583-92.
14. Momigny, J. Mass spectrometry and molecular spectroscopy, General review. *Chimica u. L Industria.* 1968;50(6):707-12.
15. Nic, M, Jirat J, Kosata B. Mass-to-charge ratio, m/z in mass spectrometry. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology.* 2006;1351(10):ISBN 0-9678550-9-8.
16. MCLAFFERTY FW. Tandem mass spectrometry (MS-MS) – Promising new analytical technique for specific component determination in complex mixtures. *Acc o Chem Research.* 1980;13(2): 33-9.
17. Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Graham Cooks R. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom.* 2005 Apr;40(4):430-43.

-
18. Govardhan CP. Crosslinking of enzymes for improved stability and performance. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999;10:331–35.
 19. Chen RO, Felciano R, Altman RB. RIBOWEB: linking structural computations to a knowledge base of published experimental data. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 1997;5:84–7.
 20. Baranov PV, Kubarenko AV, Gurvich OL, Shamolina TA, Brimacombe R. The Database of ribosomal cross-links: an update. *Nucl. Acids Res.* 1999; 27:184–85.
 21. Young MM, Tang N, Hempel JC, Oshiro CM, Taylor EW, Kuntz ID. High throughput protein fold identification by using experimental constraints derived from intramolecular cross-links and mass spectrometry. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2000;97:5802–6.
 22. Buxton GV, Greenstock CL, Helman WP, Ross AB. Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals in aqueous solution. *J Phys Chem Ref Data* 1988;270:513–886.
 23. Maleknia SD, Downard K. Radical approaches to probe protein structure, folding, and interactions. *Mass Spec Rev.* 2001 Jan;20(6):388–401.
 24. Wang L, Chance MR. Structural Mass Spectrometry of Proteins Using hydroxyl Radical Based Footprinting. *Anal Chem.* 2011 Oct 1;83(19):7234–41
 25. Xu G, Chance MR. Radiolytic modification and reactivity of amino acid residues serving as structural probes for protein footprinting. *Anal. Chem.* 2005;77:4549–55.
 26. Takamoto K, Chance MR. Radiolytic Protein Footprinting with Mass Spectrometry to Probe the Structure of Macromolecular Complexes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2006;35:251–76.
 27. Kiselara JG, Chance MR. Future directions of structural mass spectrometry using hydroxyl radical footprinting. *J Mass Spectrom.* 2010 Dec;45(12):1373–82.
 28. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol.* 2008 Dec;26(12):1367–72.
 29. Kessner D, Chambers M, Burke R, Agus D, Mallick P. ProteoWizard: Open Source Software for Rapid Proteomics Tools Development. *Bioinformatics.* 2008 Nov 1;24(21):2534–6.

-
30. Götze M, Pettelkau J, Schaks S, Bosse K, Ihling CH, Krauth F, Fritzsche R, Kühn U, Sinz A. StavroX--a software for analyzing crosslinked products in protein interaction studies. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2012 Jan;23(1):76-87. Epub 2011 Oct 25.
 31. Chen H, Ahsan SS, Santiago-Berrios MB, Abruña HD, Webb WW. Mechanisms of quenching of Alexa fluorophores by natural amino acids. *J Am Chem Soc.* 2010 Jun 2; 132(21):7244-5
 32. Chance MR. *Mass Spectrometry Analysis for Protein Protein Interactions and Dynamics.* ISBN 978-0-470-25886-6 296. 2008 Aug;86-9.
 33. Tullius T. DNA Footprinting with the Hydroxyl Radical. *Free Rad. Res.* 1991; 13(1): 521-529.
 34. Willard L, Ranjan A, Zhang H, Monzavi H, Boyko RF, Sykes BD, Wishart DS. VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Res.* 2003 July 1;31 (13):3316-19
 35. Yasuki U, Takayuki M, Masakata S, Aikito K. Effect of Atmospheric Gas Composition on Reaction Behavior of Low Porosity Carbon Composite Iron Ore Pellet. *Tetsu to Hagane.* 2003; 89(12):1205-11.
 36. Battino R, Rettich RT, Tominaga T. The solubility of Nitrogen and Air in Liquids. *J. Phys. Chem.* 1984;13:563.
 37. LaVerne JA. Reaction rates of the hydrate electron with n₂o in high temperature water and potential surface of the n₂o anion. *Rad. Research.* 2000 Feb;153(2):196-200.
 38. Buxton GV, Greenstock CL, Helman WP, Ross AB. OH Radicals and Oxidizing Products in the Gamma Radiolysis of Water. *Anal Chem.* 2009 Apr;81(7):2496–2505.
 39. Edwards EJ, Wilson PP, Anderson MH, Mezyk SP, Pimblott SM. An apparatus for the study of high temperature water radiolysis in a nuclear reactor: Calibration of dose in a mixed neutron/gamma radiation field. *Rev. Sci. Instrum.* 2007;78:101-124.
 40. Janik I, Ulanski P, Rosiak JM, von Sonntag C. Hydroxyl-radical-induced reactions of the poly(vinyl methyl ether) model 2,4-dimethoxypentane in the absence and presence of dioxygen: a pulseradiolysis and product study. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* 2000;10:2034–2040.
 41. Hamill W. Model for the radiolysis of water. *J. Phys. Chem.* 1969; 73(5):1341–1347.

-
42. Bielski BHJ, Allen AO. Mechanism of Disproportionation of Superoxide Radicals. *Journal of Physical Chemistry* 1977;81(11):1048–1050.
 43. Johnson SP, Cook P, Lui X. Universal mechanism for breaking amide bonds by ionizing radiation. *Chem. Phys.* 2011;135:44-49.
 44. Myers DK, Bide W, Tribe TA. Effect of X-radiation on the tryptic digestion of Albumin an erythrocyte membrane proteins. *Can. J. Bioch.* 1967 Dec; 45(12):1973-83.
 45. Watson C, Janik I, Zhuang T, Sharp RJ, Pulsed Electron Beam Water Radiolysis for Sub-Microsecond Hydroxyl Radical Protein Footprinting. *Anal. Chem.* 2009;81(7):2496-505.
 46. Xu G, Chance MR. Secondary reactions and strategies to improve quantitative protein footprinting. *Anal. Chem.* 2005 Mai;15(77):3029-7.
 47. Ta XH, Holm L, Yoon CN, Han SK. Dali server: conservation mapping in 3D. *Nuc. Acid Res.* 2010 Jan; 38(2):545-9.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Masterarbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und andere als die in der Diplomarbeit angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

.....

Tommy Hofmann, Chemnitz den 31.8.2012