

Funktionelle Proteomik

Affinitätsbasierte Markierung von Proteinfamilien mit reversiblen Inhibitoren – ein Konzept für die funktionelle Proteomik^{**}

Miriam C. Hagenstein, Jan H. Mussgnug, Kirsten Lotte, Regina Plessow, Andreas Brockhinke, Olaf Kruse* und Norbert Sewald*

Professor Hans-Dieter Jakubke zum 70. Geburtstag gewidmet

Die Proteomanalyse, eine der leistungsfähigsten Techniken der Postgenom-Ära, basiert auf der zweidimensionalen Trennung von Proteinen.^[1] Da eine Zelle gewöhnlich mehr als 10000 unterschiedliche Proteine gleichzeitig exprimiert, bleibt die Auflösung jedoch oft unvollständig. Ein weiteres Problem betrifft die sensitive Detektion und Quantifizierung, da konventionelle Färbemethoden nicht selektiv und mitunter schwer reproduzierbar sind. Detektionsmethoden mit fluoreszierenden Farbstoffen sind hochempfindlich, doch ist die Quantifizierung schwierig, da der Farbstoff vor der Trennung unspezifisch kovalent mit den Proteinen verknüpft wird und eine einheitliche Markierung schwer zu erzielen ist. Extensive Markierung kann zu Fluoreszenzlösung und Löslichkeitsproblemen führen.^[2] Folglich ist eine selektive Markierung mit Reportergruppen (z.B. Fluoreszenzfarbstoffen, radioaktiven Markern oder Biotin) auf einer mechanistischen Grundlage wünschenswert.

Ein erfolgversprechender Ansatz ist die Verknüpfung der Reportergruppe mit irreversiblen Enzym-Inhibitoren, da so im Verlauf der Enzymreaktion eine kovalente Bindung zum Enzym entsteht. Der aktivitätsbasierte Nachweis hat sich bei der Markierung von Serinproteasen mit Fluorophosphonaten^[3]

[*] Prof. Dr. N. Sewald, Dipl.-Chem. M. C. Hagenstein
Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie
Organische und Bioorganische Chemie
Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld (Deutschland)
Fax: (+49) 521-106-8094
E-mail: norbert.sewald@uni-bielefeld.de
Dr. O. Kruse, Dipl.-Biol. J. H. Mussgnug
Universität Bielefeld, Fakultät für Biologie
Molekulare Zellphysiologie
Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld (Deutschland)
Fax: (+49) 521-106-6410
E-mail: olaf.kruse@uni-bielefeld.de
Dipl.-Chem. K. Lotte, Dipl.-Chem. R. Plessow, Dr. A. Brockhinke
Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie
Physikalische Chemie

[**] Dieses Projekt wurde von der Universität Bielefeld und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Die Autoren danken Prof. J. Mattay für die Möglichkeit zur Nutzung der photochemischen Apparaturen, Dr. K. Niehaus und N. Kuepper für die MALDI-TOF-MS-Analyse, Dr. M. Letzel für die ESI-MS-Analyse und Dr. K. Stembera für hilfreiche Diskussionen bezüglich der SPR-Untersuchungen.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

und von Cysteinproteasen mit Epoxiden^[4] als irreversiblen Inhibitoren als tauglich erwiesen (Abbildung 1a). Dieses Konzept hat jedoch den Nachteil, dass irreversible Enzym-Inhibitoren erforderlich sind. Dies schränkt seine Anwend-

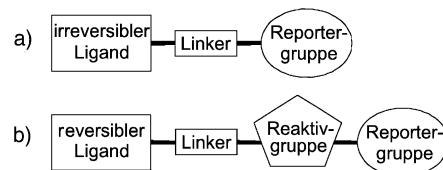


Abbildung 1. Mechanismusbasierte Markierung von Proteinen mit a) irreversiblen und b) reversiblen Inhibitoren.

barkeit erheblich ein, da für viele Proteinklassen keine irreversibel bindenden Liganden bekannt sind. Des Weiteren geht die Trennung von Proteinmischungen mit 2D-PAGE (2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) üblicherweise mit denaturierenden Bedingungen einher, sodass die Methode auf die überwiegende Mehrheit der Proteinfamilien nur nach erheblichen Änderungen anwendbar ist.

Wir haben diese Strategie für die Anwendung in der Proteomforschung verallgemeinert. Da eine kovalente Bindung zwischen Protein und Reportergruppe notwendig ist, damit unter den Bedingungen der 2D-Elektrophorese keine Dissoziation eintritt, ist ein zusätzlicher chemischer Schritt erforderlich. Nur wenige chemische Reaktionen sind für diese Art der Proteinmodifizierung geeignet; zu diesen zählen die Photoreaktionen, die in der Biochemie häufig für Photoaffinitätsmarkierungen eingesetzt werden.^[5] Auf dieser Basis wurde eine maßgeschneiderte chemische Sonde entworfen, bestehend aus einem reversibel bindenden Proteinliganden (Inhibitor), verknüpft mit einer Reporter- und einer Reaktivgruppe (Photoaffinitätsmarker) (Abbildung 1b). Dieses Konzept ist für viele Proteinklassen anwendbar und dürfte auch die Auffindung neuer Mitglieder einer Proteinfamilie erleichtern. Jede Methode, die die Datenmenge reduzieren und mechanistisch verwandte Proteine in 1D- oder 2D-PAGE detektieren kann, wird für die Auffindung bisher unbekannter Proteine und die zukünftige Entwicklung der Proteomforschung hilfreich sein. Zur Erprobung unseres Konzepts wurden die Isochinolinsulfonamide der H-Serie (H-8, H-9 usw.)^[6] als erste Modell-Inhibitoren herangezogen.

Isochinolinsulfonamide inhibieren kompetitiv eine große Auswahl von Kinasen, darunter Proteinkinasen, indem sie die ATP-Bindungsstelle besetzen. Kinasen spielen in vielen regulatorischen Vorgängen aller lebender Zellen eine bedeutende Rolle. Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen steuern wichtige Stoffwechsel- oder Krankheitsprozesse und sind an internen und externen Anpassungsmechanismen beteiligt. Jüngste Fortschritte in der Kinaseforschung beruhen auf der systematischen Analyse vollständig sequenzierter Genome, allerdings bleibt die Korrelation von Genom und Proteom schwierig.

Unsere ersten Experimente galten der Detektion von Kinasen in Pflanzen. Obwohl die Funktionen von Proteinkinasen in Pflanzen mittlerweile gut verstanden werden, bleibt die Zuordnung vieler kürzlich durch systematische Genom-

analyse identifizierter Kinase-Gene problematisch. Von besonderem Interesse in Pflanzen sind Serin- und Threoninkinasen, die in mehr als zwölf Gruppen unterteilt werden. Insbesondere in Chloroplasten sollen etliche Serin- und Threoninkinasen an Anpassungsmechanismen als biologische Antwort auf veränderte Umweltbedingungen (z.B. Licht) beteiligt sein.^[7-9] Die Sensitivität der Proteinphosphorylierung der Lichtsammelproteine (LHCs) und der Proteine des Photosystems II gegen Inhibitoren der Kinase C und cAMP-abhängige Kinasen ist beschrieben worden.^[10,11] Der Inhibitor H-9 (**1a**; Schema 1)^[12] vom Isochinolinsulfonamid-Typ inhibiert die Phosphorylierung von LHCII-Proteinen in Konzentrationen von 50–100 μM vermutlich durch Wechselwirkung mit der ATP-Bindungsstelle membranassozierter Threoninkinasen. Bis vor kurzem – als durch einen genombasierten Ansatz die Identifizierung einer Kinase gelang, die Annahmen zufolge an der LHC-Phosphorylierung beteiligt ist – gab es keinen eindeutigen Nachweis für eine Kinase in den Thylakoidmembranen von *Chlamydomonas reinhardtii*.^[13]

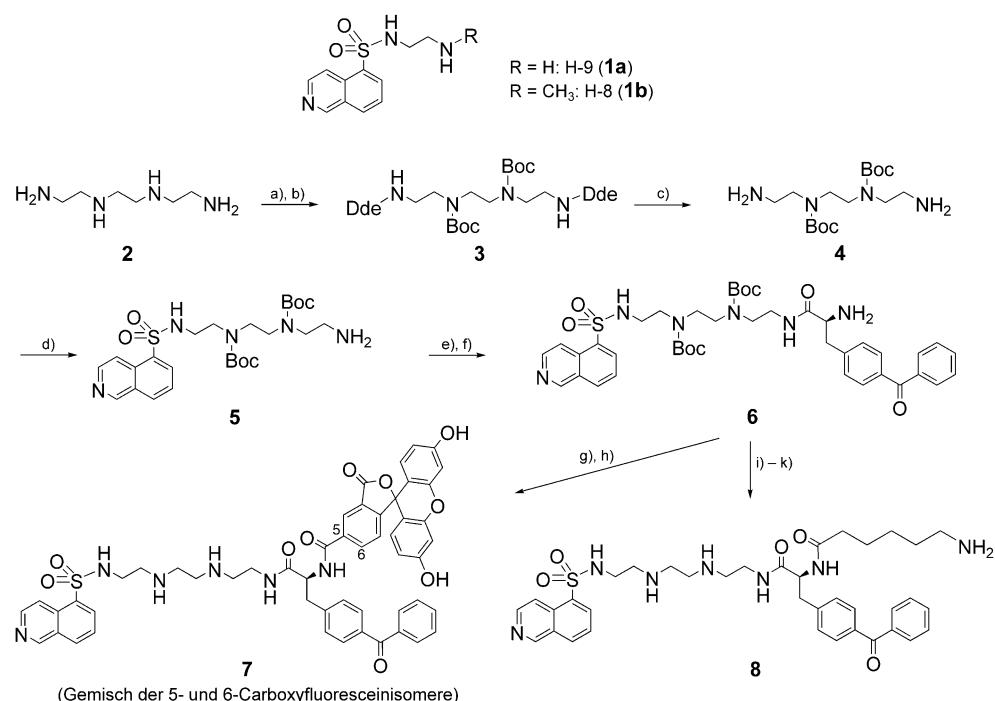
Das Konjugat **7**, bestehend aus H-9, einem polaren Linker, einer photoreaktiven Gruppe und einem Fluorophor, wurde als maßgeschneiderte chemische Sonde zur Identifizierung von Kinasen nach kovalenter Markierung und Protein-Trennung mit SDS-PAGE (SDS = Natriumdodecylsulfat) entwickelt. Die Anknüpfstelle für den Linker wurde auf Basis der Kristallstruktur eines Proteinkinase-Inhibitor-Komplexes (mit H-8, **1b**) so gewählt, dass die Bindung des Inhibitors durch die Verknüpfung nur minimal beeinflusst

wird.^[14] 4-Benzoylphenylalanin wurde als photoreaktive Gruppe ausgewählt, da es reversibel in Anregungs-Relaxations-Zyklen aktiviert werden kann und im Tripletzustand bevorzugt in C-H-Bindungen inseriert, die bis zu 3.1 Å vom Carbonylsauerstoff entfernt sein können. Es ist in protischen Lösungsmitteln stabil und führt zu effizienter Modifizierung.^[5]

Die Synthese von **7** beginnt mit dem Dde-Schutz (Dde = 2-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)ethyl) der primären Aminogruppen von **2** (Schema 1). Butoxycarbonyl(Boc)-Schutz der sekundären Aminogruppen ergibt den orthogonal geschützten Linker **3**. Die Hydrazinolyse der Dde-Gruppen führt zu **4**, das mit 5-Isochinolinsulfonylchlorid zu **5** umgesetzt wird. Das Isochinolinsulfonamid **5** wird dann mit 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-geschütztem L-4-Benzoylphenylalanin (Fmoc-Bpa-OH) verknüpft. Durch Abspaltung der Fmoc-Gruppe wird das freie Amin **6** erhalten, das mit dem Isomerengemisch von 5- und 6-Carboxyfluorescein gekuppelt wird. Es können beliebige Reportergruppen (z. B. Farbstoffe) eingesetzt werden. Im letzten Schritt wird durch die Entfernung der Boc-Gruppen das Zielmolekül **7** erhalten.

Die Affinität des modifizierten H-9 (**7**) zu Kinasen wurde mit Oberflächenplasmonresonanz nachgewiesen (Abbildung 2). Die Synthese des Konjugats **8**, einem immobilisierbaren Analogon von **7** (Schema 1), erfolgt durch Kupplung von **6** mit Fmoc-6-aminohexansäure, gefolgt von vollständigem Entschützen.

Es wurde gezeigt, dass Proteinkinase A (PKA) und Kreatinkinase^[15] konzentrationsabhängig binden (Abbildung



Schema 1. Synthese der chemischen Sonde **7**, bestehend aus dem Kinase-Inhibitor H-9 (**1a**), der photoreaktiven Gruppe 4-Benzoylphenylalanin und der fluoreszierenden Reportergruppe 5(6)-Carboxyfluorescein. Das Konjugat **8**, ein Derivat von **7**, kann auf einem Oberflächenplasmonresonanz-Sensorchip immobilisiert werden. a) 2-Acetyltrimedon, DMF, 74%; b) Boc₂O, CH₂Cl₂, 89%; c) N₂H₄·H₂O, CH₂Cl₂, 45%; d) 5-Isochinolinsulfonylchlorid·HCl, NEt₃, CHCl₃, 63%; e) EDC-HCl, NMM, Fmoc-Bpa-OH, HOBT·H₂O, DCM, 68%; f) 4-(Aminomethyl)piperidin, CH₂Cl₂, 85%; g) EDC-HCl, NMM, 5(6)-Carboxyfluorescein (Isomerengemisch), HOBT·H₂O, CH₂Cl₂/DMF (1:1), 45%; h) TFA (30% in CH₂Cl₂), 99%; i) EDC-HCl, NMM, Fmoc-6-aminohexansäure, HOBT·H₂O, CH₂Cl₂, 52%; j) 4-(Aminomethyl)piperidin, CH₂Cl₂, 92%; k) TFA (30% in CH₂Cl₂), 98%. NMM = N-Methylmorpholin, EDC-HCl = 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid, TFA = Trifluoressigsäure.

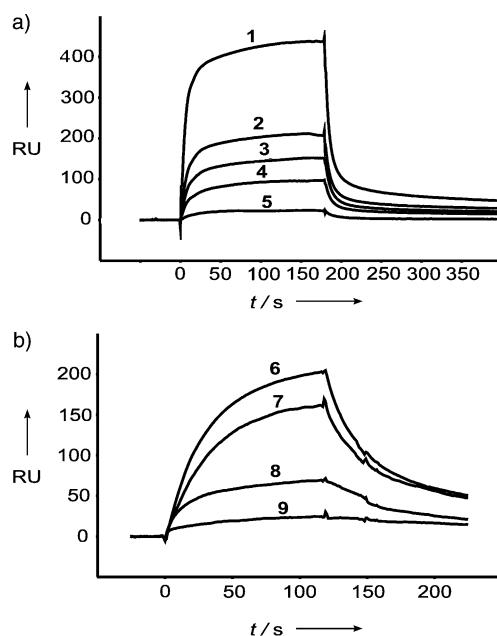


Abbildung 2. Oberflächenplasmonresonanz-Sensorogramme: a) konzentrationsabhängige Bindung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) an immobilisiertes **8**: 1) 120 nM, 2) 60 nM, 3) 30 nM, 4) 15 nM, 5) 7.5 nM; $K_D = (2 \pm 3) \times 10^{-7}$ M. b) Kompetition mit H-9 (1a): 6) 24 nM PKA, 7) 24 nM PKA + 19 nM H-9, 8) 24 nM PKA + 184 nM H-9, 9) 24 nM PKA + 1.85 μ M H-9. RU = Response Unit.

dung 2a). Durch Vorinkubation des entsprechenden Proteins mit einer Reihe von löslichen Liganden wie H-9 (1a; Abbildung 2b), **7** und **8** konnte die Bindung reduziert oder sogar aufgehoben werden.^[15] Diese Experimente belegen eindeutig, dass die Konjugation von H-9 (1a) mit Bpa und Reportergruppen die Bindung an die Modellkinasen nicht signifikant beeinflusst. Der K_D -Wert für die Wechselwirkung von PKA mit immobilisiertem **8**^[16] beträgt $(2 \pm 3) \times 10^{-7}$ M und ähnelt dem für **1a** und PKA in der Literatur angegebenen K_D von 1.9×10^{-6} M.^[12] Darüber hinaus konnte für eine Reihe von Proteinen (Hämoglobin, Ovalbumin, Rinderserumalbumin, α -Glucosidase) gezeigt werden, dass die unspezifische Bindung an immobilisiertes **8** unbedeutend ist.

Um die Effekte eines möglichen strahlungsgenossenen Fluoreszenzresonanzenenergiotransfers (FRET) in **7** zu untersuchen – insbesondere zwischen dem Tripletzustand des Benzophenons und dem benachbarten Fluorescein –, wurde die Anregungs-Emissions-Spektroskopie (EES) eingesetzt.^[15,17] Es wurde herausgefunden, dass die Fluoreszenz-Quantenausbeute sowohl für **1a** als auch für 4-Benzoylphenylalanin sehr gering ist ($\Phi_{Fl} \approx 10^{-4}$).

Durch Vergleich der normalisierten Emissionsspektren von **7** und der analogen Verbindung ohne Photoreaktivgruppe konnte bei $\lambda_{ex} = 350$ nm ($\Phi_{FRET} \leq 10^{-2}$) kein signifikanter FRET festgestellt werden. Der Energietransfer zwischen H-9 und Fluorescein erwies sich in allen Fällen als unbedeutend ($\Phi_{FRET} \leq 10^{-4}$). Folglich sind Quenching und chemische Reaktion die entscheidenden Verlustwege nach Photoaktivierung bei dieser Wellenlänge.

Im nächsten Schritt wurden aufgereinigte Proteine für Markierungsexperimente mit **7** eingesetzt. Vier kommerzielle

Kinasen wurden verglichen, um die Spezifität der Photoaffinitätsmarkierung mit dem photoreaktiven fluoreszierenden Inhibitor **7** zu belegen. Drei Kinasen (Abbildung 3, Bahnen 1, 2, 4) wurden durch die Photoaffinitätsmarkierung mit **7** in hohem Ausmaß fluoreszenzmarkiert, während die vierte

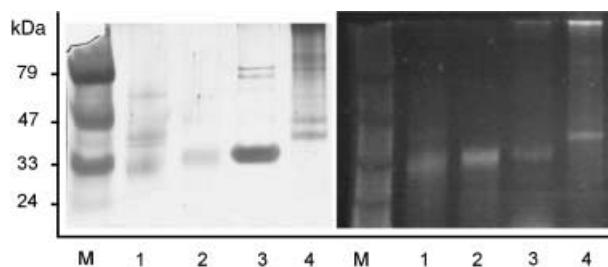


Abbildung 3. Spezifische Photoaffinitätsmarkierung von Kinasen mit dem H-9-Derivat **7**. Links: Silberfärbung, rechts: Fluoreszenzbild. Bahn 1: Hexokinase, Bahn 2: Kreatinkinase, Bahn 3: 3PGA-Phosphokinase, Bahn 4: cAMP-abhängige Proteinkinase A, M: vorgefärbter Proteinmarker.

(Bahn 3) nur eine sehr schwache Markierungseffizienz für **7** aufwies, obwohl sie höher konzentriert vorlag. Die Spezifität der Photoaffinitätsmarkierung bestimmter Kinasen mit **7** wird nochmals bestätigt durch die Tatsache, dass im Fall der Hexokinase und der cAMP-abhängigen Proteinkinase A nur die katalytische Untereinheit markiert wird, während die regulatorische Untereinheit unmarkiert bleibt.

Um zu zeigen, dass unsere Methode zur affinitätsbasierten Identifizierung mutmaßlicher Kinasen geeignet ist, wurde Kreatinkinase vor der Inkubation und Photoreaktion mit **7** mit SDS behandelt (Abbildung 4a, Bahnen 2, 4). Die drastische Abnahme der Fluoreszenz in der vorinkubierten Probe (Bahn 4) im Vergleich zur Referenz (Bahn 3) macht deutlich,

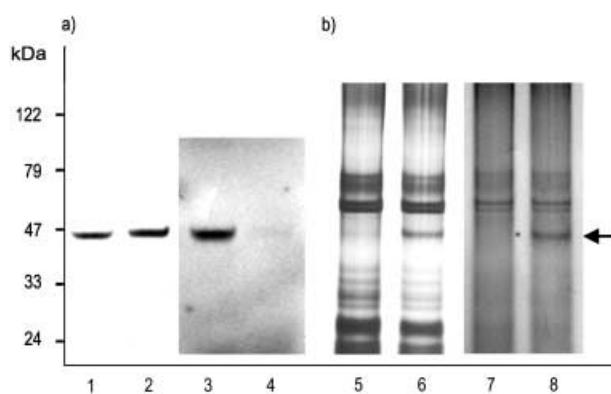


Abbildung 4. Selektive Photoaffinitätsmarkierung mit **7**. a) Vergleich der Effizienz der Photoaffinitätsmarkierung von nativer und denaturierter Kreatinkinase. Bahn 1: Silberfärbung, native Kreatinkinase; Bahn 2: Silberfärbung, denaturierte Kreatinkinase; Bahn 3: Fluoreszenzbild, native Kreatinkinase; Bahn 4: Fluoreszenzbild, denaturierte Kreatinkinase. b) Nachweis von hinzugefügter Kreatinkinase aus Thylakoidmembran-Präparaten nach der Photoaffinitätsmarkierung. Bahn 5: Silberfärbung; Bahn 6: Silberfärbung, mit zusätzlichen 150 ng Kreatinkinase; Bahn 7: Fluoreszenzbild; Bahn 8: Fluoreszenzbild, mit zusätzlichen 150 ng Kreatinkinase (siehe Pfeil).

dass die Photoaffinitätsmarkierung mit **7** spezifisch erfolgt, da das SDS-denaturierte Protein nicht markiert wurde. In einem zweiten Ansatz wurde vor der Markierung Kreatinkinase zu isolierten Thylakoidproteinen gegeben. Die Ergebnisse zeigen, dass durch das H-9-Derivat **7** mehrere Thylakoidmembranproteine mit einem Molekulargewicht überwiegend zwischen 40 und 80 kDa markiert wurden (Abbildung 4b, Bahn 7). Die zu dem Thylakoidmembranpräparat gegebene Kreatinkinase konnte wiedergefunden werden (Abbildung 4b, Bahn 8). Die markierte Proteinbande bei 45 kDa wurde anschließend mit MALDI-TOF-MS-Fingerprint-Analyse^[15] als die hinzugefügte Kreatinkinase identifiziert, wodurch die Funktionalität der Markierungsmethode in Kombination mit der Massenspektrometrie eindeutig demonstriert wird.^[18] Die Identifizierung und Charakterisierung der anderen markierten Proteine ist derzeit im Gange.

Die Selektivität des Markierungsprozesses mit **7** wird auch dadurch belegt, dass die LHC-Proteine (Abbildung 4, Molmassen < 33 kDa) nicht markiert werden. Um auszuschließen, dass andere photochemische Prozesse (z. B. Photooxidation) die gewünschte C-H-Insertion des Benzophenon-Triplets überwiegen, wurden Photoaffinitätskontrollexperimente mit einem Konjugat ohne den Inhibitorteil (Linker-Bpa-Carboxyfluorescein) sowie mit Carboxyfluorescein allein durchgeführt.^[15]

Die maßgeschneiderte chemische Sonde **7**, die aus dem reversibel bindenden Proteinliganden H-9, einer fluoreszierenden Reportergruppe und einer photoreaktiven Gruppe besteht, ermöglicht die affinitätsbasierte Markierung von Kinasen. Die selektive Detektion von Kinasen in der funktionellen Proteomik ist damit möglich. Das Konzept ist darüber hinaus allgemein anwendbar für das affinitätsbasierte Markieren von Proteinen. Es wird in unseren Arbeiten zunächst Anwendung finden auf plastidäre pflanzliche Serin- und Threoninkinasen unter Verwendung neuer Techniken^[18] für die Thylakoidproteinuntrennung mit 2D-Gelelektrophorese, gefolgt von Isolierung und weiterer Identifizierung. Die Anwesenheit basischer Gruppen in **7** kann nach der Markierung zu einer Veränderung des pI-Wertes des Proteins führen. Dies könnte in einer Entkopplung von markierten und unmarkierten Proteinen während der isoelektrischen Fokussierungsphase der 2D-Gelelektrophorese resultieren. Weitere Experimente zur Behebung dieses Mangels werden derzeit durchgeführt. Dennoch kann die Methode in ihrer gegenwärtigen Form zur Auffindung neuer Kinasen eingesetzt werden.

Eingegangen am 10. Juni 2003,
veränderte Fassung am 15. September 2003 [Z52084]

Stichwörter: Fluoreszenzmarker · Inhibitoren · Kinasen · Photoaffinitätsmarkierung · Proteomik

- [3] Y. Liu, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 14 694–14 699.
- [4] D. Greenbaum, K. F. Medzihradzky, A. Burlingame, M. Bogyo, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 569–581.
- [5] G. Dormán, G. N. Prestwich, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 64–77.
- [6] N. Ono-Saito, I. Niki, H. Hidaka, *Pharmacol. Ther.* **1999**, *82*, 123–131.
- [7] A. Gal, H. Zer, I. Ohad, *Physiol. Plant.* **1997**, *100*, 869–885.
- [8] J. F. Allen, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1098*, 275–335.
- [9] O. Kruse, *Naturwissenschaften* **2001**, *88*, 284–292.
- [10] Z. Ishak, I. R. White, P. A. Millner, *Biochem. Soc. Trans.* **1992**, *20*, 8S.
- [11] J. Farchaus, R. A. Dilley, W. A. Cramer, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *809*, 17–26.
- [12] H. Hidaka, M. Inagaki, S. Kawamoto, Y. Sasaki, *Biochemistry* **1984**, *23*, 5036–5041.
- [13] N. Depège, S. Bellfiore, J.-D. Rochaix, *Science* **2003**, *299*, 1572–1575.
- [14] R. A. Engh, A. Girod, V. Kinzel, R. Huber, D. Bossemeyer, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 26 157–26 164.
- [15] Siehe Hintergrundinformationen.
- [16] Die Immobilisierung von **8** auf einem BIAcore-CM5-Sensorchip erfolgte durch Aktivierung der oberflächengebundenen Carboxygruppen mit EDC/NHS. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Bildung der Amidbindung überwiegend durch die primäre Aminogruppe erfolgt.
- [17] A. Brockhinke, R. Plessow, P. Dittrich, K. Kohse-Höinghaus, *Appl. Phys. B* **2000**, *71*, 755–763.
- [18] M. Hippler, J. Klein, A. Fink, T. Allinger, P. Hoerth, *Plant J.* **2001**, *28*, 595–606.

-
- [1] F. Lottspeich, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2630–2647; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2476–2492.
 - [2] *Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods* (Hrsg.: T. Rabilloud), Springer, Heidelberg, **2000**.