

Entwicklung spaltbarer Quervernetzungsreagenzien für die Peptid- und Proteinstrukturanalyse



Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
– Biowissenschaften –
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

vorgelegt von

Herr M. Sc. Christoph Hage

Gutachter:

1. Prof. Dr. Andrea Sinz
2. Prof. Dr. Mathias Schäfer
3. Prof. Dr. Mike Schutkowski

Disputation am 16. Oktober 2024 in Halle (Saale)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-------------|
| Abbildungsverzeichnis | IV |
| Tabellen- und Formelverzeichnis | VII |
| Abkürzungsverzeichnis | VIII |
| Zusammenfassung | XI |
| Summary | XV |
| 1 Einleitung und Zielstellung | 1 |
| 2 Massenspektrometrie | 6 |
| 2.1 Massenspektrometrische Grundlagen | 6 |
| 2.2 Der Elektrospray-Prozess und die Elektrosprayionisation | 6 |
| 2.3 Erzeugung von Massenspektren | 9 |
| 2.3.1 Massenanalytoren und Massendetektoren | 9 |
| 2.3.2 Quadrupol und ionenleitende Multipole | 10 |
| 2.3.3 Lineare Ionenfalle | 12 |
| 2.3.4 Orbitrap-Massenanalysator | 13 |
| 2.3.5 Aufbau des Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometers | 15 |
| 3 Vernetzungsreagenzien für die Proteinstrukturanalyse | 17 |
| 3.1 Peptidsequenzierung und Nomenklatur der Peptidfragmente | 20 |
| 3.2 Nomenklatur der Quervernetzungsprodukte..... | 21 |
| 3.3 Probleme der Zuordnung von Quervernetzungsprodukten..... | 22 |
| 3.4 Identifizierungsstrategien von Quervernetzungsprodukten | 23 |
| 3.4.1 Isotopenmarkierung der Vernetzungsreagenzien | 25 |
| 3.4.2 Hochgenaue Masse und Massendefekt | 26 |
| 3.4.3 Massenspektrometrisch-spaltbare Vernetzungsreagenzien | 29 |
| 3.5 Beschreibung der verwendeten Vernetzungsreagenzien | 38 |
| 3.5.1 N, N' -Carbonyldiimidazol | 38 |
| 3.5.2 TEMPO-Bz-Cross-Linker (TEMPO-Bz-Linker)..... | 39 |
| 3.5.3 Brom-Urea-Cross-Linker (BrPU-Linker) | 40 |
| 3.5.4 Imidodicarbonsäurediimidazol-Cross-Linker (IDDI-Linker)..... | 42 |
| 4 Materialien und Methoden | 43 |
| 4.1 Chemikalien | 43 |
| 4.1.1 Verwendete Vernetzungsreagenzien | 44 |
| 4.1.2 Puffer, Lösungen und Laufmittel..... | 46 |
| 4.1.3 Peptide | 46 |
| 4.1.4 Proteine | 47 |
| 4.1.5 Proteolytische Enzyme | 47 |
| 4.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien | 47 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.3 | Software..... | 49 |
| 4.4 | Präparative Methoden..... | 49 |
| 4.4.1 | Pufferauswahl und Pufferaustausch bei Peptidproben für ESI-MS..... | 49 |
| 4.4.2 | Untersuchungen mittels SDS-Gelelektrophorese | 50 |
| 4.4.3 | Enzymatische Proteolyse | 51 |
| 4.5 | Durchführung der Vernetzungsreaktionen | 52 |
| 4.5.1 | Vernetzungsstudien des TEMPO-Bz-Linkers mit Peptiden..... | 52 |
| 4.5.2 | Vernetzungsstudien an Peptiden mit Tempo-Bz- und Br-PU -Linker | 53 |
| 4.5.3 | CDI, CDP, CDT, DSC..... | 54 |
| 4.5.4 | Vernetzungsstudien an Peptiden mit IDDI-Linker | 56 |
| 4.6 | Massenspektrometrische Methoden | 56 |
| 4.6.1 | Statisches Nano-Elektrospray..... | 56 |
| 4.6.2 | MS/MS- und MS ³ -Experimente | 57 |
| 4.6.3 | Nano-HPLC-MS/MS | 58 |
| 4.6.4 | Auswertung mittels MeroX Software..... | 59 |
| 5 | Quervernetzung mit N,N'-Carbonyldiimidazol | 59 |
| 5.1 | Zielstellung | 59 |
| 5.2 | Auswahl und Reaktivität der eingesetzten Vernetzungsreagenzien | 59 |
| 5.3 | Anwendung..... | 62 |
| 5.4 | Vorversuche mit Rinder-Serumalbumin (BSA) | 62 |
| 5.4.1 | Maximal überbrückbare C _α -C _α -Abstände und auftretende Spaltprodukte | 71 |
| 5.4.2 | Analyse mittels MeroX-Software und Zuordnung der Quervernetzungsprodukte zur Röntgenkristallstruktur des Rinder-Serumalbumins | 72 |
| 5.5 | Vernetzung von p53 und GCAP-2 mit CDI | 76 |
| 6 | Quervernetzung mit TEMPO-Bz-Linker | 79 |
| 6.1 | Zielstellung | 79 |
| 6.2 | Vorarbeiten unter (+)-ESI-Bedingungen..... | 80 |
| 6.3 | Radikalübertragung und Nomenklatur der Seitenkettenfragmente | 82 |
| 6.4 | Testung an Peptiden..... | 85 |
| 6.5 | FRIPS von Angiotensin II | 86 |
| 6.5.1 | Vergleich der Fragmentierung zum TEMPO-Benzyl-Labeling Reagenz mittels Typ 0-quervernetztem Angiotensin II im (+)- und (-)-ESI-Modus | 86 |
| 6.5.2 | Typ 2-quervernetztes Angiotensin II in (-)-ESI | 88 |
| 6.6 | Unerwartete Fragmentierung von vernetztem Angiotensin II und ACTH | 90 |
| 6.7 | FRIPS von Testpeptid 1..... | 91 |
| 6.8 | Sequenzielle Fragmentierung der Spaltfragmente des Testpeptids 1 | 95 |
| 7 | Quervernetzung mit BrPU..... | 100 |
| 7.1 | Zielstellung | 100 |
| 7.2 | Auswahl der Modellpeptide und Reaktionsbedingungen | 101 |
| 7.3 | Erwartetes Fragmentierungsverhalten und Nomenklatur der Fragmente..... | 101 |
| 7.4 | Testung der Fragmentierung an Modellpeptiden mittels CID und HCD | 102 |
| 7.5 | Isotopenmuster der Vorläuferionen | 110 |

| | | |
|-----------|---|----------------|
| 8 | Quervernetzung mit IDDI..... | 113 |
| 8.1 | Zielstellung | 113 |
| 8.2 | Konzeption des Reagenzes und Synthese von Imidodicarbonsäurediimidazol..... | 114 |
| 8.3 | Automatisierte Auswertung der MS/MS-Spektren für Modellpeptide..... | 116 |
| 9 | Diskussion..... | 118 |
| 9.1 | N, N' -Carbonyldiimidazol..... | 118 |
| 9.2 | TEMPO-Bz-Cross-Linker..... | 120 |
| 9.3 | Brom-Urea-Cross-Linker..... | 121 |
| 9.4 | Imidodicarbonsäurediimidazol-Cross-Linker..... | 125 |
| 10 | Literaturverzeichnis..... | XVIII |
| 11 | Danksagung | XXXVI |
| 12 | Eidesstattliche Erklärung..... | XXXVII |
| 13 | Lebenslauf..... | XXXVIII |
| 14 | Publikationen und Tagungsbeiträge | XXXIX |
| 15 | Anhang | XLII |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1 Schematischer Ablauf eines Vernetzungsexperiments | 5 |
| Abbildung 2 Schematische Darstellung des nESI- Sprayprozesses | 7 |
| Abbildung 3 Gegenüberstellung der Ionisierung nach IEM, CRM und CEM | 8 |
| Abbildung 4 Schematische Funktionsweise eines linearen Quadrupols | 11 |
| Abbildung 5 Schematischer Aufbau einer linearen Ionenfalle | 12 |
| Abbildung 6 Schematische Funktionsweise des Orbitrap-Massenanalysators | 14 |
| Abbildung 7 Aufbau des Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometers | 15 |
| Abbildung 8 Erzeugung eines Reporterions bei Fragmentierung des BID-Linkers | 19 |
| Abbildung 9 Nomenklatur der Peptidfragmente nach Roepstorff und Biemann | 21 |
| Abbildung 10 Schematische Darstellung: Quervernetzungsprodukte nach Schilling | 22 |
| Abbildung 11 Isotopenmarkiertes (deuteriertes) Quervernetzungsreagenz BS ² G | 25 |
| Abbildung 12 Bildung und CID-Spaltung des SuDP-Quervernetzungsprodukts | 30 |
| Abbildung 13 Peptidmassenbestimmung und Suchraumreduktion durch erzeugte Dubletts | 31 |
| Abbildung 14 Edman-Abbau und MS-spaltbarer „Edman-Linker“ | 33 |
| Abbildung 15 Aus dem Edman Linker abgeleitete Spaltstellen von BuTuBu und BuUrBu... | 33 |
| Abbildung 16 Charakteristisches „Massendublett“ nach Spaltung eines disubstituierten Harnstoffs | 34 |
| Abbildung 17 Reagenzien zur Erzeugung von Peptidradikalen | 36 |
| Abbildung 18 Derivatisierungen einer Aminogruppe zur Erzeugung radikalischer Modifikationen..... | 37 |
| Abbildung 19 Struktur von N,N'-Carbonyldiimidazol und Analoga | 38 |
| Abbildung 20 Chemische Struktur des TEMPO-Bz-Linkers | 40 |
| Abbildung 21 Chemische Struktur des BrPU-Linkers | 41 |
| Abbildung 22 Struktur von CDI und Imidodicarbonsäurediimidazol | 42 |
| Abbildung 23 Reaktivitäten von CDI mit verschiedenen Nukleophilen..... | 60 |
| Abbildung 24 Bildung von Kohensäurederivaten aus CDI. | 61 |
| Abbildung 25 SDS-PAGE-Analyse BSA-Vernetzung mit CDI, CDP, CDT und DSC..... | 63 |
| Abbildung 26 Venn-Diagramm 10-facher molarer Überschuss CDI zu BSA. | 66 |
| Abbildung 27 Venn-Diagramm 20-facher molarer Überschuss CDI zu BSA | 67 |
| Abbildung 28 Venn-Diagramm 50-facher molarer Überschuss CDI zu BSA. | 69 |
| Abbildung 29 Kollisionsinduzierte Spaltung der CDI- Quervernetzungsprodukte | 71 |
| Abbildung 30 Von MeroX-Software zugeordnetes CDI-Quervernetzungsprodukt des BSA . | 73 |
| Abbildung 31 Produktionenspektrum mit unerwartetem „CO“-Fragment eines Serins..... | 74 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 32 Strukturmodell des BSA mit CDI-Quervernetzungen | 75 |
| Abbildung 33 Strukturmodell des tetrameren p53 nach Okorokov et al | 77 |
| Abbildung 34 Strukturmodell des GCAP-2 (PDB ID: 1JBA) | 79 |
| Abbildung 35 Alternative Fragmentierungsreaktion von TEMPO-Bz-Linker in (+)-ESI | 80 |
| Abbildung 36 Fragmentierungsverhalten von TEMPO-Bz-Linker im (-)-ESI-Modus | 81 |
| Abbildung 37 Primäre Radikalübertragungen des TEMPO- und Benzoyl-Fragments des TEMPO-Bz-Linker | 83 |
| Abbildung 38 Die zwei hauptsächlich beobachteten, radikalischen Spaltungen der Aminosäureseitenkette am Beispiel von Leucin. | 84 |
| Abbildung 39 Ausgewählte Beispiele der abgespaltenen Seitenkettenfragmente | 84 |
| Abbildung 40 CID-MS/MS des Typ 2-Quervernetzungsprodukts von Angiotensin II und TEMPO-Bz-Linker (Vorläuferion m/z 1194,600), mod. nach [254] | 89 |
| Abbildung 41 CID-MS/MS des Typ 2-Quervernetzungsprodukts von ACTH (18-39) und TEMPO-Bz-Linker (Vorläuferion m/z 1742,170) | 91 |
| Abbildung 42 Massenspektrum der Quervernetzungsprodukte von Testpeptid 1 mit dem TEMPO-Bz-Linker | 92 |
| Abbildung 43 CID-MS/MS des dreifach deprotonierten Typ 2- Produkts von Testpeptid 1 bei 35% NCE (m/z 831,750) | 94 |
| Abbildung 44 Automatisierte Zuordnung der Fragmentationen des dreifach geladenen Typ 2-Produkts von Testpeptid 1 und TEMPO-Bz-Linker | 94 |
| Abbildung 45 CID-MS ³ des zweifach geladenen „Bz“- modifizierten Peptids TESTDIKR, (m/z 531,753, 35% NCE) | 96 |
| Abbildung 46 CID-MS ³ des zweifach geladenen „TEMPO“-modifizierten Peptids TESTDIKR (m/z 564,295, 35% NCE) | 97 |
| Abbildung 47 CID-MS ³ des zweifach geladenen „Bz“- modifizierten Peptids EADYLINKER (m/z 682,325, 35% NCE) | 98 |
| Abbildung 48 CID-MS ³ des zweifach geladenen „TEMPO“-modifizierten Peptids EADYLINKER (m/z 714,867, 35% NCE) | 99 |
| Abbildung 49 Isotopenmuster der Massenmodifikation durch BrPU und dessen Fragmente | 101 |
| Abbildung 50 Fragmentierung von BrPU im (-)-ESI | 102 |
| Abbildung 51 CID-MS/MS des Typ 2-Produkts von EAA | 103 |
| Abbildung 52 HCD-MS/MS des Typ 2-Produkts von EAA | 103 |
| Abbildung 53 CID-MS/MS des Typ 2-Produkts von DAA | 104 |
| Abbildung 54 HCD-MS/MS des Typ 2-Produkts von DAA | 105 |

| | |
|---|--------|
| Abbildung 55 CID-MS/MS des Typ 2-Produkts von VVA..... | 105 |
| Abbildung 56 HCD-MS/MS des Typ 2-Produkts von VVA | 106 |
| Abbildung 57 CID-MS/MS des Typ 2-Produkts von Angiotensin II | 107 |
| Abbildung 58 HCD-MS/MS des Typ 2- Produkts von Angiotensin II..... | 107 |
| Abbildung 59 CID-MS/MS des Typ 2- Produkts von Testpeptid 1 | 108 |
| Abbildung 60 HCD-MS/MS des Typ 2- Produkts von Testpeptid 1..... | 109 |
| Abbildung 61 Simulierte Isotopenmuster einer doppelt bromierten Spezies und eines unbromierten Peptids mit ~ 1,5 kDa | 110 |
| Abbildung 62 Isotopenmuster des Typ 2-Quervernetzungsprodukts von EAA | 111 |
| Abbildung 63 Simulierte Isotopenmuster einer doppelt bromierten Spezies und eines unbromierten Peptids mit ~ 3 kDa | 112 |
| Abbildung 64 Isotopenmuster des Typ 2- Quervernetzungsprodukts von Angiotensin II..... | 112 |
| Abbildung 65 Simulierte Isotopenmuster einer doppelt bromierten Spezies und eines unbromierten Peptids mit ~ 6 kDa | 113 |
| Abbildung 66 Reaktivitäten von IDDI mit verschiedenen Nukleophilen | 115 |
| Abbildung 67 Harnstoffartige Spaltung der Biuret-Gruppe nach Quervernetzung | 116 |
| Abbildung 68 HCD-MS/MS, Typ 2– Quervernetzungsprodukt von Angiotensin II und IDDI-Linker (Vorläuferion m/z 721,025)..... | 117 |
| Abbildung 69 Reaktionsverhalten von CDI gegenüber Aminen, Alkoholen und Wasser | 119 |
| Abbildung 70 Simulierte Isotopenmuster eines doppelt bromierten Peptids, einer einfach bromierten Spezies und eines unbromierten Peptids mit ~ 3 kDa..... | 124 |
| Abbildung 71 Strukturvorschlag eines modifizierten BrPU-Linkers, beispielhaft mit zwei quartären Aminen, ohne Gegenionen..... | 125 |
| Abbildung 72 Schematische Darstellung der Fragmentierungsmuster der Bz-, bzw. TEMPO- modifizierten Peptide | XLVII |
| Abbildung 73 HCD-MS/MS, Typ 2-Quervernetzungsprodukt von MRFA und IDDI-Linker (Vorläuferion m/z 558,750)..... | XLVII |
| Abbildung 74 HCD-MS/MS, Typ 2– Quervernetzungsprodukt von Thymopentin und IDDI-Linker (Vorläuferion m/z 476,900)..... | XLVIII |
| Abbildung 75 HCD-MS/MS, Typ 2– Quervernetzungsprodukt von Substanz P und dem IDDI-Linker (Vorläuferion m/z 921,800) | XLVIII |

Tabellen- und Formelverzeichnis

| | | |
|------------|--|-------|
| Tabelle 1 | <i>Strukturen von ausgewählten homo-, hetero- und trifunktionellen Quervernetzungsreagenzien</i> | 18 |
| Tabelle 2 | <i>Massendefekte einiger ausgewählter Isotope nach Sleno et al</i> | 27 |
| Tabelle 3 | <i>UIPAC Bezeichnungen der verwendeten Quervernetzungsreagenzien</i> | 44 |
| Tabelle 4 | <i>Zusammensetzung der 10%-igen SDS-Polyacrylamidgele</i> | 51 |
| Tabelle 5 | <i>Reaktionsansätze der Peptidstudien von TEMPO-Bz-Linker und Br-PU</i> | 54 |
| Tabelle 6 | <i>Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten der Hydrolyse verschiedener N-Acetylazole</i> | 60 |
| Tabelle 7 | <i>Geschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse einiger N,N'-Carbonylbisazole in THF/Wasser (40:1) bei 27°C</i> | 61 |
| Tabelle 8 | <i>Bedingungen für den Nachweis von Quervernetzungsprodukten der Azolide mit BSA mittels MeroX-Analyse bei 10-fach molarem Überschuss an Reagenz</i> | 64 |
| Tabelle 9 | <i>Anzahl identifizierter Quervernetzungsprodukte von CDI mit BSA</i> | 65 |
| Tabelle 10 | <i>Anzahl identifizierter Quervernetzungsprodukte von CDI mit BSA (20-fach)</i> | 67 |
| Tabelle 11 | <i>Anzahl identifizierter Quervernetzungsprodukte von CDI mit BSA (50-fach)</i> | 68 |
| Tabelle 12 | <i>Aufstellung zusätzlich auftretender Vernetzungsprodukte bei pH 8,0, 20°C und ansteigendem molarem Überschuss CDI</i> | 70 |
| Tabelle 13 | <i>Maximal überbrückbare C_α-C_α-Abstände reaktiver Aminosäuren mit CDI</i> | 71 |
| Tabelle 14 | <i>Fragmentationen von Typ 0- quervernetzten Angiotensin II in (+)- und (-)-ESI</i> | 88 |
| Tabelle 15 | <i>th. m/z-Werte der Typ 2- Produkte von Testpeptid 1 und TEMPO-Bz-Linker</i> | 93 |
| Tabelle 16 | <i>Übersichtstabelle der theoretischen Massen der Seitenketten- und Neutralverluste der Aminosäuren</i> | XLII |
| Tabelle 17 | <i>Modellpeptide und deren Tempo-Bz-Typ 2- Quervernetzungsprodukte</i> | XLIII |
| Tabelle 18 | <i>m/z- Werte der möglichen Tempo-Bz-Typ 2- Quervernetzungsprodukte</i> | XLIV |
| Tabelle 19 | <i>m/z- Werte der möglichen Tempo-Bz-Typ 0 und Typ 1- Quervernetzungsprodukte</i> | XLIV |
| Tabelle 20 | <i>m/z- Werte der möglichen Produktionen im MS/MS von Tempo-Bz-Typ 2- Quervernetzungsprodukten</i> | XLV |
| Tabelle 21 | <i>Struktur und Länge einiger spaltbarer Quervernetzungsreagenzien</i> | XLVI |

| | |
|---|----|
| Formel 1 Anzahl möglicher Vernetzungsprodukte N bei n möglichen Reaktionspartnern | 4 |
| Formel 2 Rayleigh- Limit | 7 |
| Formel 3 Abhängigkeit der axialen Oszillationsfrequenz ω vom Masse-zu-Ladungsverhältnis m/z | 14 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| AcN | Acetonitril |
| AcOH | Essigsäure |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure |
| BAMG | Bis(succinimidyl)-3-azidomethylglutarat |
| BrPU | <i>Bis</i> (2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) 4,4'-carbonylbis(azanediy)l-bis-3-bromobenzoat |
| BS ² G | Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat |
| BS ³ | Bis(sulfosuccinimidyl)suberat |
| BuTuBu | Bis(succinimidylsuccinamyl)thioharnstoff |
| BuUrBu | 4-{3-[3-(2,5-Dioxo-pyrrolidin-1-yloxy-carbonyl)-propyl]-ureido}-butansäure 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl-ester, bzw. Bis(succinimidylsuccinamyl)harnstoff |
| CCRFEM | <i>Combined Charged Residue Field Emission Model</i> |
| CDI | N, N' -Carbonyldiimidazol |
| CDP | N, N' -Carbonyldipyrazol |
| CDT | N, N' -Carbonyldi(1,2,4-triazol) |
| CEM | <i>Chain Ejection Model</i> |
| CID | Kollisionsinduzierte Dissoziation (<i>Collision-Induced Dissociation</i>) |
| CRM | <i>Charged Residue Model</i> |
| cryo-EM | Kryo-Elektronenmikroskopie |
| CsI | Cäsiumiodid |
| Da | Dalton, alternative Bezeichnung für atomare Masseneinheit in der Biochemie |
| DAU | 1, 3 -Diallylurea |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DSC | Dissuccinimidylcarbonat |
| DSS | Disuccinimidylsuberat |
| DSSO | Disuccinimidylsulfoxid |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECD | Elektroneneinfangdissoziation (<i>Electron Capture Dissociation</i>) |
| EM | Elektronenmikroskopie |
| ESI | Elektrosprayionisation |
| ETciD | Elektronentransfer-Dissoziation mit zusätzlicher CID |
| ETD | Elektronentransfer-Dissoziation (<i>Electron Transfer Dissociation</i>) |
| EThcD | Elektronentransfer-Dissoziation mit zusätzlicher HCD |
| EtOH | Ethanol |
| FA | Ameisensäure (<i>Formic Acid</i>) |
| FRD | Falschidentifizierungsrate (<i>False Discovery Rate</i>) |
| FTICR | Fourier-Transformation-Ionenzyklotronresonanz |
| GCAP-2 | retinales Guanylatcyclase-aktiverenden Protein 2 |

| | |
|------------|---|
| HCD | <i>Higher Energy Collision-Induced Dissociation</i> |
| HDX | <i>Hydrogen/Deuterium Exchange</i> |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| IAA | Iodacetamid |
| IDDI | Imidodicarbonsäurediimidazol |
| IDP | Intrinsisch ungeordnetes Protein |
| IDR | Intrinsisch ungeordnete Region |
| IEM | <i>Ion Evaporation Model</i> |
| IM | Ionenmobilität |
| IM-MS | Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie |
| LC | Flüssigkeitschromatographie (<i>Liquid Chromatography</i>) |
| LIT | Lineare Ionenfalle (<i>Linear Ion Trap</i>) |
| LTQ | Lineare Ionenfalle (Markenname Thermo Fischer Scientific) |
| m | Masse |
| M | Molekulargewicht |
| <i>m/z</i> | Einheitenloses Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (in atomaren Masseneinheiten pro Elementarladungen) |
| MALDI | Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation |
| MeOH | Methanol |
| mgf | <i>Mascot Generic Format</i> |
| MS | Massenspektrometrie, Massenspektrometer |
| MS/MS | Tandem-Massenspektrometrie |
| n-ESI | Nano-Elektrosprayionisation |
| NCE | <i>Normalized Collision Energy</i> |
| NHS | N-Hydroxysuccinimid |
| NMR | Kernspinresonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>) |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PDB | <i>Protein Data Bank</i> |
| ppm | <i>Parts-Per-Million</i> |
| R | Auflösung (<i>Resolution</i>) |
| RF | Radiofrequenz |
| RISE | <i>Reporter Ion Scan Event</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| S/N | Signal-zu-Rausch-Verhältnis (<i>Signal-to-Noise Ratio</i>) |
| SAXS | Röntgenkleinwinkelstreuung (<i>Small Angle X-Ray Scattering</i>) |
| SDA | Succinimidyl-4,4'-azipentanoat |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>) |
| TCEP | Tris(2-carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid |
| TEA | Triethylamin |
| TEAAc | Triethylammoniumacetat |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TEMPO-Bz | 1-[2-(2,5-Dioxopyrrolidine-1-yloxy-carbonyl)-benzyloxy]-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-carbonsäure 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl ester |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| Th | Thompson |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| u | Atomare Masseneinheit |

| | |
|-----|---------------------------|
| v/v | Volumen pro Volumen |
| w/v | Masse pro Volumen |
| w/w | Masse pro Masse |
| XL | Cross-Linking, Cross-Link |
| z | Ladungszahl |

Proteinogene Aminosäuren

| | Drei-Buchstaben-Code | Ein-Buchstaben-Code |
|----------------|----------------------|---------------------|
| Alanin | Ala | A |
| Arginin | Arg | R |
| Asparagin | Asn | N |
| Asparaginsäure | Asp | D |
| Cystein | Cys | C |
| Glutamin | Gln | Q |
| Glutaminsäure | Glu | E |
| Glycin | Gly | G |
| Histidin | His | H |
| Isoleucin | Ile | I |
| Leucin | Leu | L |
| Lysin | Lys | K |
| Methionin | Met | M |
| Phenylalanin | Phe | F |
| Prolin | Pro | P |
| Serin | Ser | S |
| Threonin | Thr | T |
| Tryptophan | Trp | W |
| Tyrosin | Tyr | Y |
| Valin | Val | V |

Modifizierte Aminosäuren

| | | |
|-------------------------------|-------------------|---|
| Oxidiertes Methionin | Met _{ox} | m |
| Carbamidomethyliertes Cystein | | B |

Zusammenfassung

Proteine üben ihre Funktionen in allen lebenden Organismen durch Interaktionen mit anderen Molekülen aus. Eigenschaften und Funktionen von Proteinen innerhalb der Zelle können durch strukturelle Änderungen der beteiligten Biomoleküle auf molekularer Ebene erklärt werden. Daher ist es ein grundlegendes Ziel der Strukturbiologie, die molekularen Strukturen der beteiligten aktiven Komplexe der Biomoleküle mit möglichst hoher Auflösung – im besten Fall atomarer Auflösung – aufzuklären. Röntgenkristallographie, NMR-Spektroskopie und (Kryo)-Elektronenmikroskopie erscheinen daher als prädestinierte Techniken, um dieses Ziel zu erreichen. Aber auch die Massenspektrometrie (MS), welche keine direkten räumlichen Informationen zur Strukturaufklärung zu liefern scheint, kann benutzt werden, um komplementäre Strukturinformationen zu gewinnen.

In dieser Arbeit wurde besonderer Wert auf die Peptid- und Proteinstrukturanalytik mittels Quervernetzung gelegt. Die Aufklärung der dreidimensionalen Strukturen von Proteinkomplexen ist bedeutsam, da die Mehrzahl der biologischen Prozesse nicht nur durch ein Protein, sondern durch Proteinkomplexe vermittelt werden. Obwohl weitere Kofaktoren, wie Nukleinsäuren, Zucker oder Lipide an regulatorischen, katalytischen oder strukturbildenden Prozessen beteiligt sein können, war das Ziel dieser Arbeit, vorerst nur ausgewählte Peptide, Proteine und Proteinkomplexe exemplarisch durch die Nutzung von Quervernetzungsreagenzien zu untersuchen. Ratio des hier verwendeten Ansatzes der chemischen Quervernetzung besteht darin, gezielt reaktive Aminosäureseitenketten der Peptide/Proteine mittels (Quervernetzungs-)Reagenzien kovalent zu verbinden. Die molekulare Länge des verwendeten Reagenzes stellt dabei ein Maximum der überbrückbaren Distanz der adressierten Aminosäureseitenketten dar. Die gewählte Reaktivität des Quervernetzungsreagenz ermöglicht zudem die Adressierung spezieller Aminosäuren. Die anschließende massenspektrometrische Analyse der entstandenen Quervernetzungsprodukte ermöglicht die Erzeugung von Abstandsnetzwerken der verbrückten individuellen Aminosäuren. Durch die gleichzeitige Sequenzanalyse der verbrückten Peptide wird versucht, eine Zuordnung innerhalb der Aminosäuresequenz eines Proteins bzw. zu den Proteinen eines zusammengesetzten Proteinkomplexes zu erhalten. Ändern Kofaktoren oder andere Reaktionsbedingungen die Zusammensetzung oder Struktur der Komplexe, unterscheiden sich die erzeugten Netzwerke. Die erhaltenen Abstandsnetzwerke ermöglichen zunächst keine vollständige Rekonstruktion der Proteinstruktur. Zudem ergeben die a priori vielfältigen Möglichkeiten an Quervernetzungen einen immensen Suchraum, den es zur Sequenzierung zu betrachten gilt. Andererseits können Quervernetzungsreaktionen sogar an lebenden Systemen

durchgeführt werden und ermöglichen Untersuchungen an vergleichsweise winzigen Probemengen unter nahezu physiologischen Bedingungen.

Ziel dieser Arbeit war die Erprobung und (Weiter-)Entwicklung von speziellen Quervernetzungsreagenzien, welche eine massenspektrometrische Spaltbarkeit aufweisen. Werden solche spaltbaren Quervernetzungsreagenzien verwendet, geht die Spaltstelle in das gebildete Quervernetzungsprodukt der verbrückten Aminosäuren über. Im Rahmen der massenspektrometrischen Sequenzierung mittels Fragmentierung entstehen daher für die jeweilige Spaltstelle charakteristische Spaltprodukte im Fragmentionenspektrum der Quervernetzungsprodukte. Diese charakteristischen Spaltprodukte können mehrere Eigenschaften aufweisen. Zum einen können die entstandenen Spaltprodukte reaktiv sein und sekundäre Fragmentierungsreaktionen auslösen, die die Sequenzierung erleichtern. Häufiger genutzt wird jedoch die Tatsache, dass bekannte Spaltprodukte als Massenmodifikationen der verbundenen Aminosäure aufgefasst werden können und somit eine Sequenzierung erleichtern. Entstehen zudem asymmetrische Spaltprodukte, können die erzeugten komplementären Fragmentierungsprodukte prinzipiell als Fingerabdruck im Rahmen einer automatisierten Suche verwendet werden, um Spektren auszuwählen, die eindeutig von Quervernetzungsprodukten stammen. Zeigt ein Quervernetzungsreagenz mit hinreichender Qualität solche charakteristischen Fragmentierungsmuster, kann der quadratische Suchraum an Quervernetzungsprodukten drastisch reduziert werden und eine Untersuchung komplexer Systeme (Proteom-weite Untersuchungen) rückt in den Bereich des Möglichen.

In dieser Arbeit wurden vier Quervernetzungsreagenzien auf ihre Spaltbarkeit und der von ihnen sekundär ausgelösten Fragmentierungsreaktionen untersucht. Dabei war das Fragmentierungsverhalten von drei der vier Verbindungen vorher nicht beschrieben.

Zuerst werden Versuche zur Reaktivität, Spaltbarkeit und Anwendbarkeit von N,N'-Carbonyldiazolen untersucht und im Besonderen die Eignung von N,N'-Carbonyldiimidazol (CDI) zur Quervernetzung gezeigt. Unter den verglichenen Diazolen zeigt CDI ein gutes Verhältnis von Reaktivität und Hydrolysestabilität. Im Besonderen erweist sich die Bildung von Harnstoffen und Urethanen aus Aminen und Alkoholen der Aminosäureseitenketten bei einer Quervernetzung mittels CDI als nützlich. Diese weisen eine gute MS-Spaltbarkeit auf und liefern asymmetrische Fragmente, die zuvor schon bei Harnstoff-basierten Quervernetzungsreagenzien zur automatisierten Datenauswertung verwendet werden konnten. Nach Testungen an Modellpeptiden und bovinen Serumalbumin wurde CDI verwendet, um sowohl Studien am Tumorsuppressorprotein p53, als auch am retinalen Guanylatcyclase-aktivierenden Protein 2 durchzuführen, welches am Sehprozess beteiligt ist.

Ein zweiter Ansatz bestand darin, ein homolytisch spaltbares Reagenz zu verwenden, welches durch massenspektrometrische Spaltung zwei asymmetrische und zudem radikalische Fragmente generiert, der TEMPO-Bz-Linker. Neben der Nutzung der asymmetrischen Spaltprodukte wurde eine zusätzliche Fragmentierung der Peptidketten innerhalb des Massenspektrometers durch die erzeugten freien Radikale angestrebt. Dieser Prozess ist als *free-radical-induced-peptide-sequencing* (FRIPS) bekannt und wurde für vergleichbare Labeling-Reagenzien an Modellpeptiden bereits untersucht. Ziel der hier durchgeführten Arbeiten waren vergleichende Untersuchungen zu Fragmentierungsreaktionen unter (+)-ESI und (-)-ESI-Bedingungen, also an Kationen und Anionen der Quervernetzungsprodukte. Vorarbeiten deuteten darauf hin, dass unter (+)-ESI-Bedingungen eine konkurrierende heterolytische Spaltung des Reagenz auftritt und eine Radikalbildung ausbleibt. Unter (-)-ESI-Bedingungen ist diese Reaktion unterdrückt, sodass die gewünschte homolytische Fragmentierung auftritt und zu sekundären Fragmentierungsreaktionen der Peptide führt. Die Untersuchungen wurden an mehreren Peptiden durchgeführt und mit FRIPS-Ergebnissen anderer Gruppen gegenübergestellt. Umfangreiche Spektren wurden zugeordnet und eine Nomenklatur für die beobachteten Seitenkettenfragmentierungen erarbeitet. Dabei wurde die prinzipielle Anwendbarkeit des TEMPO-Bz-Linker unter (-)-ESI-Bedingungen gezeigt und exemplarisch die reichhaltigen radikalischen Fragmentspektren zugeordnet, was zur Diskriminierung von Leucin und Isoleucin genutzt werden konnte.

Ein dritter verfolgter Ansatz benutzte ein dibromiertes Harnstoff-basiertes Reagenz, den BrPU-Linker, um die Verwendung eines Massendefekts und die Veränderung von Isotopenmustern während der Fragmentierung zur Identifikation von Quervernetzungsprodukten zu nutzen. Das charakteristische Isotopenmuster von natürlich vorkommendem Brom (^{79}Br und ^{81}Br) mit einem nominalen Massenabstand von 2u und einer nahezu äquivalenten Abundanz, sowie eines sehr hohen Massendefekts beider Isotope führte zur Konzeption des BrPU-Linkers. Das bereitgestellte Reagenz sollte anhand von Peptidstudien auf seine, für Harnstoff-basierte Reagenzien typische, Spaltbarkeit untersucht werden. Zum anderen wurden Überlegungen angestellt, ob eine automatische Auswahl von Quervernetzungsprodukten durch den Massendefekt des Broms möglich wären. Zudem wurde das Fragmentierungsverhalten dahingehend untersucht, ob eine Nutzung des natürlich auftretenden Isotopenmusters zu einer automatisierten Datenauswertung geeignet wäre.

Das letzte beschriebene Reagenz Imidodicarbonsäurediimidazol (IDDI) stellt den Versuch dar, die Eigenschaften des CDI und der Azolid-vermittelten Quervernetzung dahingehend zu modifizieren, dass ein Reagenz erhalten werden könnte, welches im Gegensatz zum CDI eine

Position aufweisen würde, die chemisch modifiziert werden könnte. Auch wenn die Synthese von IDDI gelang und eine prinzipielle Reaktivität analog des CDI gezeigt werden konnte, konnte die Synthese eines modifizierten Analogons nicht zufriedenstellend ausgeführt werden. Dennoch zeigen die Versuche an IDDI, dass prinzipiell Biuret-artige Spaltungsstellen – als gespiegelte Harnstoffe - in der von Harnstoffspaltungsstellen bekannten Weise fragmentieren.

Summary

Proteins exert their functions by interactions with other molecules in all living organisms. Structural biology assumes that the properties and functions of protein complexes within the cell can be explained at the molecular level by structural changes of the biomolecules involved. Therefore, a fundamental goal of structural biology is to elucidate the molecular structures of active complexes of biomolecules with the highest possible resolution - ideally at atomic resolution. X-ray crystallography, NMR spectroscopy, and (cryo-) electron microscopy appear to be the techniques that are optimally suited to achieve this goal. But also mass spectrometry (MS) that does not seem to provide direct spatial information for structure elucidation, might be used to obtain complementary structural information.

In this work, particular emphasis was laid on peptide and protein structure analysis using cross-linking. Elucidating the three-dimensional structures of protein complexes is highly relevant as the majority of biological processes are mediated by protein complexes rather than just one protein. Although other cofactors, such as nucleic acids, sugars or lipids, might be involved in regulatory, catalytic or structure-forming processes, the aim of this work for the time being was to investigate selected peptides, proteins, and protein complexes by using cross-linking reagents as examples. The ratio of the chemical cross-linking approach used herein is to covalently connect reactive amino acid side chains of the peptides/proteins by (cross-linking) reagents. The molecular length of the reagent used represents a maximum of the bridgeable distance of the addressed amino acid side chains. The selected reactivity of the cross-linking reagent also allows addressing specific amino acids. A subsequent mass spectrometric analysis of the resulting cross-linked products enables the generation of distance networks of the connected individual amino acids. Simultaneous sequence analysis of the connected peptides allows an assignment within the amino acid sequence of a protein, or to the proteins of a composite protein complex. If cofactors or other reaction conditions change the composition or structure of the complexes, the generated interaction networks will differ. Initially, the obtained distance networks do not allow a complete reconstruction of the protein structure. Moreover, the multiple possibilities of cross-links result in an immense search space to be considered for sequencing. On the other hand, cross-linking reactions can even be performed in living systems and allow studies on low sample amounts under almost physiological conditions.

The aim of this work was the testing and further development of special cross-linking reagents that exhibit mass spectrometric cleavability. If such cleavable cross-linking reagents are used, the cleavage site is transferred to the formed cross-linking product of the connected amino

acids. Therefore, in the course of mass spectrometric sequencing by fragmentation, characteristic cleavage products for the respective cleavage site are formed in the fragment ion mass spectrum of the cross-linking products. These characteristic cleavage products will exhibit several properties. First, the resulting cleavage products can be reactive and trigger secondary fragmentation reactions that facilitate sequencing. Known cleavage products can be interpreted as mass modifications of the linked amino acid, which greatly facilitates sequencing. In addition, if asymmetric cleavage products are generated, the complementary fragmentation products can be used as fingerprints in an automated search to select spectra that unambiguously originate from cross-linking products. If a cross-linking reagent shows such characteristic fragmentation patterns of sufficient quality, the quadratic search space of cross-linking products can be drastically reduced and an investigation of complex systems (proteome-wide investigations) becomes possible.

In this work, four cross-linking reagents were investigated regarding their cleavability and fragmentation reactions that are secondarily induced by them. Furthermore, the fragmentation behavior of three of the four compounds has not been previously described.

First, experiments on the reactivity, cleavability and applicability of N,N'-carbonyldiazoles are investigated and, in particular, the suitability of N,N'-carbonyldiimidazole (CDI) for cross-linking is shown. Among the compared diazoles, CDI shows a reasonable ratio of reactivity and hydrolysis stability. In particular, the formation of ureas and urethanes from amines and alcohols of amino acid side chains proves useful in cross-linking by CDI. These exhibit good MS cleavability and yield asymmetric fragments that could previously be used with urea-based cross-linking reagents for an automated data analysis. After testing the reagent on model peptides and bovine serum albumin, CDI was used to perform studies on both the tumor suppressor protein p53 and the protein guanylyl cyclase-activating protein-2 (GCAP-2) that is involved in the visual process.

A second approach was to use a homolytic cleavable reagent that generates two asymmetric radical fragments by mass spectrometric cleavage, the TEMPO-Bz linker. In addition to asymmetric cleavage products, additional fragmentation of the peptides in the mass spectrometer by the free radicals generated was also attempted. This process is known as free-radical-induced-peptide-sequencing (FRIPS) and has already been investigated for comparable labeling reagents on model peptides. The aim of the work performed herein was to perform comparative studies on fragmentation reactions under (+)-ESI and (-)-ESI conditions, i.e., on cations and anions of cross-linked products. Preliminary work indicated that under (+)-ESI conditions, competitive heterolytic cleavage of the reagent occurs and

radical formation is absent. Under (-)-ESI conditions, this reaction is suppressed, so that the desired homolytic fragmentation occurs and leads to secondary fragmentation reactions of the peptides. The studies were performed on several peptides and compared with FRIPS results from other groups. Extensive spectra were assigned and a nomenclature for the observed side-chain fragmentations was developed. The principle applicability of the TEMPO-Bz linker under (-)-ESI conditions was demonstrated and the rich radical fragment spectra were assigned as examples, which could be used to discriminate leucine and isoleucine.

A third approach pursued makes use of a doubly brominated urea-based reagent, the Br-PU linker, to exploit a mass defect and the change in isotopic patterns during fragmentation to identify cross-linking products. The specific isotopic structure of naturally occurring bromine (^{79}Br und ^{81}Br), with a nominal mass spacing of 2 u and a nearly equivalent abundance, as well as a very high mass defect of both isotopes, led to the design of the Br-PU linker. The provided reagent was investigated for its cleavability that is typical for urea-based reagents by peptide studies. On the other hand, it was considered whether an automated selection of cross-linking products by the mass defect of bromine would be possible. In addition, the fragmentation behavior was investigated to determine whether use of the naturally occurring isotope pattern would be suitable for automated data evaluation. The last reagent described, imidodicarbonyl diimidazole (IDDI), represents an attempt to modify the properties of CDI and azolide-mediated cross-linking to obtain a reagent that, unlike CDI, would have a position that could be chemically modified. Even though the synthesis of IDDI was successful and a reactivity in principle analogous to CDI could be shown, the synthesis of a modified analog could not be carried out satisfactorily. Nevertheless, the experiments on IDDI show that in principle Biuret-like cleavage sites - as mirrored ureas - fragment in the same manner as known from urea cleavage sites.

1 Einleitung und Zielstellung

Als 2001 das menschliche Genom durch das *Human Genome Program* sequenziert wurde, stellte dies eine Zeitenwende für die Biologie und Biochemie dar [1], [2]. Die mit der Entschlüsselung der genetischen Information verbundenen Versprechen und Hoffnungen, wie die zügige Bereitstellung personalisierter Medizin oder ein vertieftes Verständnis von Krankheitsprozessen, sind jedoch bis heute nur teilweise Realität. Da die belebte Materie als Ganzes und im stetigen Wechselspiel seiner Komponenten verstanden werden muss, genügt die Kenntnis der genetischen Information als einfache Abfolge der Basenpaare nicht, um biochemische und biologische Fragen zu beantworten. Viel mehr richtet sich der Blick auf die sich bildenden höheren molekularen Strukturen innerhalb der Zellen, ihrer Regulation und Organisation, wie schon 2001 vom *Human Genome Program* selbst angemerkt wurde [3]. Von besonderem Interesse sind die vom Erbgut codierten Proteine. Dabei erfüllen die Proteine nicht nur biokatalytische Funktionen im Stoffwechsel, sondern erzeugen z.B. auch die höheren Strukturen des Zellskeletts, sorgen für die Reparatur beschädigten genetischen Materials, bilden Rezeptoren, Poren, Transporter und sind an ihrer eigenen (Protein-)Biosynthese beteiligt [4]. Erst bei erweiterter Betrachtung wird klar, dass die Funktionsbeziehungen höherer zellulärer Strukturen von den Strukturen der zellulären Bestandteile, bis hinunter zur molekularen Ebene der Proteine, nur im wechselseitigen Zusammenspiel erfasst werden können. Erst die Interaktionen von Proteinen führen zu zellulären Wirkungen, so dass die Annahme zu vereinfachter Ursache-Wirkungs-Beziehung zu unvollständigen oder falschen Folgerungen führt. Die Untersuchung der Beschaffenheit, Bildung und Funktion von Strukturen der beteiligten Makromoleküle (Proteine, Polynukleinsäuren und Lipidmembranen) liegt dem Forschungsfeld der Strukturbiologie zugrunde [5]. Das Verständnis der Modulation ihrer Funktionen durch die Veränderung ihrer makromolekularen Strukturen ist von besonderem Interesse und deren Aufklärung häufig nur durch ein Zusammenspiel mehrerer komplexer und integrierter Analysemethoden möglich. Ein besonders dynamisches Feld der Strukturbiologie liegt in der Aufklärung von Proteinstrukturen und Proteinkomplexen. Methoden zur Untersuchung von Proteinen, wie Fluoreszenzspektroskopie, Röntgenbeugung, Kernresonanzspektroskopie (NMR) und (Kryo-)Elektronenmikroskopie werden stetig weiterentwickelt, um möglichst hoch aufgelöste dreidimensionale Abbilder der Proteinstrukturen und deren Komplexe zu erhalten. Dabei ergänzen sich diese komplementären Methoden durch ihre Vor- und Nachteile in ihrer Anwendung. Keine der genannten Methoden liefert direkt dreidimensionale Strukturinformationen. Vielmehr wird die gesuchte Struktur erst durch spezifische Auswerteverfahren der erhaltenen Daten rekonstruiert. Eine besondere

Stellung innerhalb der Strukturanalytik kommt dabei der Massenspektrometrie (MS) zu, da sie die Proteinstruktur nicht direkt abbildet. Vielmehr dienen MS-Methoden v. a. zur Sequenzierung der Proteine und - seit der Entwicklung der „weichen“ Ionisationsmethoden, wie der Matrix-unterstützten Laserdesorption/Ionisation MALDI und der Elektrosprayionisation ESI (Nobelpreis für Chemie 2002, [6]) - dem Auffinden ihrer Modifikationen. Da die MS Masse-zu-Ladung-Verhältnisse detektiert, kann zwar die Masse eines intakten Proteins bestimmt werden, aber eine Sequenzierung bzw. zweifelsfreie Identifizierung ist so zunächst nicht möglich. Erst eine vorangegangene Spaltung des intakten Proteins in kleinere Fragmente, durch beispielsweise enzymatische Proteolyse oder massenspektrometrische Fragmentierung, ermöglicht dessen eindeutige Identifizierung [7]. Dabei erlaubt die gezielte Massenbestimmung der erzeugten Peptide bzw. Peptidfragmente eine Rekonstruktion der Protein- bzw. Peptidsequenz. Identifiziert man nur die Massen der nach Proteolyse eines Proteins entstandenen Peptide (sog. *Peptidmassenfingerabdruck*), kann mittels Datenbankabgleich (*SwissProt*, *UniProt*) die Identität eines bekannten Proteins anhand der erhaltenen Peptide ermittelt werden [8]. Sollen unbekannte Peptide oder Proteine untersucht werden, wird eine zusätzliche Fragmentierung innerhalb des Massenspektrometers nötig. Durch Fragmentierungen der Aminosäurekette an verschiedenen Stellen werden komplementäre N- und C-terminale Fragmente erhalten, so dass aus dem erhaltenen Muster dieser Fragmentionen, der sog. *Sequence Ladder*- die Aminosäuresequenz- abgeleitet werden kann (*De-Novo-Sequenzierung*) [9]. Sind modifizierte Aminosäuren innerhalb der Sequenz enthalten (z. B. posttranslationale Modifikationen, unnatürliche Aminosäuren, Mutationen), kann deren Position und Masse ermittelt werden.

Eine Peptidsequenzierung ermöglicht keine Ableitung von dreidimensionalen Strukturinformationen der Proteine, jedoch können gezielt künstliche Modifikationen in das Protein eingeführt werden, welche dann mittels Massenspektrometrie detektiert werden können (z.B. *SILAC*, *ICAT*, *ICPL*, vgl. [10]). Somit lassen sich vergleichende strukturelle Aussagen anhand der abweichenden Sequenzierungen treffen. Es lässt sich abbilden, welche Teile des Proteins dem Lösungsmittel zugänglich sind, wenn z.B. Wasserstoff-Deuterium-Austausch-Experimente (*Hydrogen/Deuterium Exchange*, *HDX*) durchgeführt werden und nur bestimmte (dem deuterierten Wasser zugängliche) Sequenzabschnitte deuteriert gefunden werden. Auch eine Lokalisierung eingeführter kovalenter Modifikationen von bestimmten Aminosäuren ist mittels Sequenzierung möglich (*kovalentes Labeling*). Umfassende Informationen der räumlichen Strukturen der Proteine werden mit diesen Ansätzen jedoch nur bedingt erhalten, da sie nur Modifikationen einzelner Aminosäuren erfassen.

Erst die Verwendung von hochauflösender MS in Kombination mit chemischen Quervernetzungsreagenzien eröffnete die Möglichkeit, aus massenspektrometrischen Daten direkt (räumliche) Strukturinformationen abzuleiten, indem eine chemische Verbrückung von Aminosäuren (mittels des Quervernetzers) zu ihrer räumlichen Distanzbestimmung herangezogen wird [11]–[13]. Bemerkenswert ist, dass der gezielte Einsatz von Quervernetzungsreagenzien (abgesehen von Aldehyden zur Proteinfixierung) in der Proteinbiochemie relativ alt ist (1958, Zahn *et al.* [14], [15]). Aber erst die Einführung der Elektrosprayionisation (ESI) und die Entwicklung immer leistungsfähigerer Massenspektrometer führte zu vielen unabhängigen (auf die jeweilige Anwendung und Quervernetzungsstrategie angepassten) Synthesestrategien für Quervernetzungsreagenzien durch mehrere Arbeitsgruppen [16].

Ein Quervernetzungsreagenz (Cross-Linker) besteht aus mindestens zwei reaktiven Kopfgruppen und dem sogenannten „*Spacer*“. Während die Wahl der reaktiven Kopfgruppen die Selektivität gegenüber den adressierbaren Aminosäuren bestimmt, stellt der *Spacer* einen einstellbaren, molekularen Abstandshalter dar. Anhand der durch die chemische Struktur des Reagenzes festgelegten Länge des Quervernetzungsreagenzes können nur Aminosäuren vernetzt werden, deren räumliche Distanz eine Reaktion mit reaktiven Kopfgruppen des Quervernetzungsreagenzes erlaubt. Der vom verwendeten Reagenz maximal überbrückbare Abstand wird als „molekulares Lineal“ genutzt und erlaubt die Nutzung der erhaltenen Quervernetzungsprodukte zur Strukturaufklärung. Durch die massenspektrometrische Identifizierung der verbrückten Aminosäuren und die erhaltenen Abstandsobergrenzen sind strukturelle Aussagen über deren räumlichen Abstand ableitbar. Mehr noch: Durch die Variation der Länge des Reagenzes lässt sich eine Mindestlänge für eine positive Verbrückung auffinden. So ermöglicht ein kurzes Reagenz zwar weniger Quervernetzungen, die erhaltenen Abstandsobergrenzen sind jedoch strikter. Die räumliche Auflösung ist im Vergleich höher. Die aus der Quervernetzung abgeleiteten Abstandsobergrenzen dienen aufgrund ihrer Unschärfe meist als Komplement zu Strukturinformationen anderer strukturbiochemischer Techniken. Sie können helfen, widersprüchliche Modellstrukturen zu verifizieren oder zu falsifizieren. Hervorzuheben ist, dass die Größe des untersuchten Proteinsystems, im Gegensatz zu den meisten anderen Techniken der Proteinstrukturanalyse, unbegrenzt ist.

In einem Experiment können sehr viele Quervernetzungsprodukte entstehen. Dabei steigt die theoretische Anzahl möglicher Quervernetzungsprodukte und potentieller Abstandsinformationen quadratisch mit der Anzahl der verbrückbaren Aminosäuren, was in der Datenauswertung als n^2 -Problem bekannt ist (siehe Formel 1).

$$N = \frac{n * (n - 1)}{2} + n = \frac{n * (n + 1)}{2}$$

N... Anzahl der möglichen Quervernetzungsprodukte
n... Anzahl der vernetzbaren Peptide

Formel 1 Anzahl möglicher Vernetzungsprodukte N bei n möglichen Reaktionspartnern

Die benötigten Probemengen sind durch die hohe Sensitivität der MS sehr klein (üblicherweise im fmol-Bereich [17]). Im Gegensatz zu anderen strukturbioologischen Methoden kann die Quervernetzungsreaktion in wässrigen, den physiologischen Bedingungen ähnlichen Puffersystemen bei physiologisch üblichen Proteinkonzentrationen durchgeführt werden (10^{-6} bis 10^{-4} M [18]). Neuere Entwicklungen zielen darauf ab, die Quervernetzungsreaktion sogar direkt in lebenden Zellen durchzuführen (in vivo Cross-Linking) [19], [20].

Die Möglichkeit, nicht nur einzelne Proteine, sondern auch Proteinkomplexe an ihren Interaktionsregionen kovalent zu verknüpfen, erlaubt die Identifizierung der Interaktionspartner von Proteinen, die Erstellung von Interaktionsnetzwerken, aber auch die Eingrenzung der beteiligten oder zugänglichen Interaktionsstellen. Auch unter physiologischen Bedingungen stattfindende Konformationsänderungen können durch vergleichende Quervernetzungsexperimente untersucht werden [21].

Die Ursache der erst jüngeren Verwendung von chemischer Quervernetzung mit anschließender massenspektrometrischer Analyse ist durch zwei Schwierigkeiten begründet: Zum einen wird die Komplexität der massenspektrometrischen Probe im Vergleich zu einer reinen Peptidprobe durch die Erzeugung einer quadratisch wachsenden Anzahl von potentiellen Produkten überproportional stark erhöht (n^2 -Problem). Auch stehen die niedrigen Konzentrationen der entstehenden Quervernetzungsprodukte einem komplexen Probenhintergrund gegenüber. Erst nach Rekonstruktion der Sequenzinformationen der beiden vernetzten Peptide kann eine eindeutige Identifizierung der Quervernetzungsstelle innerhalb der Vielzahl möglicher Vernetzungsprodukte mittels hochauflösender MS erfolgen. Zum Anderen wurde die sich anschließende Zuordnung der gefundenen Fragmente erst mittels weiterentwickelter bioinformatischer Lösungen möglich [22]. Bis heute stellen die hohen Anforderungen an die Qualität der massenspektrometrischen Daten und deren biologische Zuordnung das eigentliche Nadelöhr der Methode dar. Erst durch Fortschritte in der Bioinformatik und der MS-Technologie in den vergangenen Jahren entwickelte sich die Cross-Linking-MS-Methode zu einer akzeptierten Routinetechnik für die Proteinstrukturanalyse. Die Stärke der Methode offenbart sich in der Anwendung von integrierten Ansätzen unter Verwendung von KI-basiertem Modeling, um die dreidimensionalen Strukturen von Proteinkomplexen aufzuklären [23].

Ein schematischer Ablauf eines Vernetzungsexperimentes ist in Abbildung 1 dargestellt.

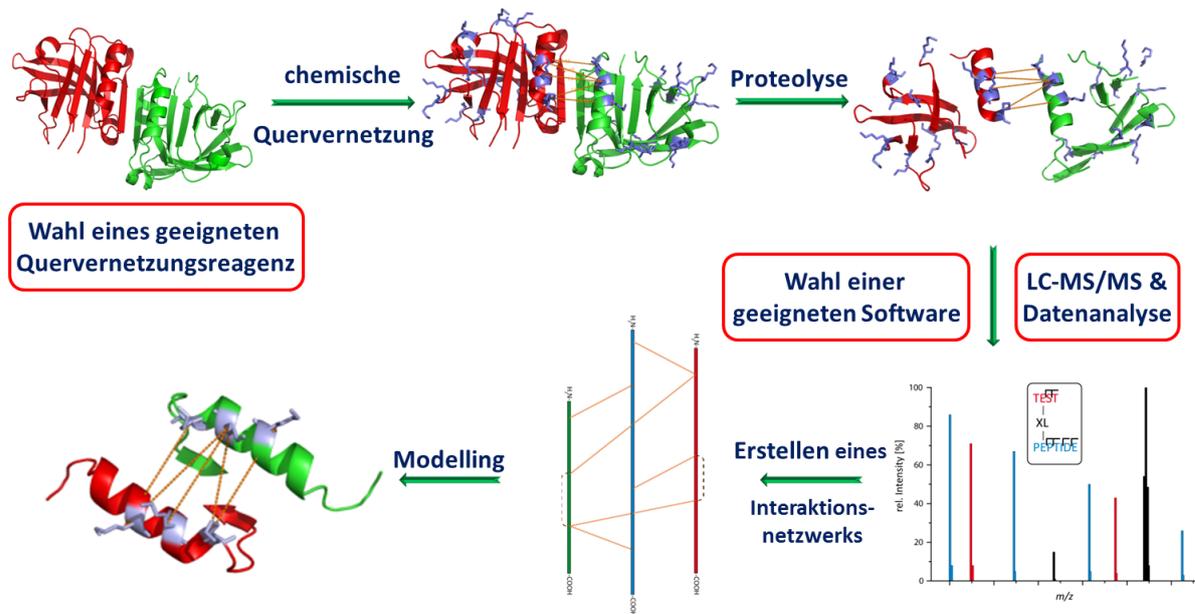


Abbildung 1 Schematischer Ablauf eines Vernetzungsexperiments

In Anbetracht der Komplexität der Daten werden neue informatische Lösungsansätze der Auswertung entwickelt. Dennoch kann eine automatisierte Datenauswertung und die sichere Zuordnung der Quervernetzungsprodukte nur sichergestellt werden, wenn das verwendete Quervernetzungsreagenz durch ein wohlüberlegtes Design den Anforderungen der massenspektrometrischen Analyse entgegenkommt. Deshalb besteht trotz der hohen Anzahl veröffentlichter und bereits zum Teil kommerziell erhältlicher Quervernetzungsreagenzien ein weiterer Bedarf für verbesserte Reagenzien, die durch charakteristische chemische Modifikationen, wie Isotopenmarkierung, Anreicherbarkeit oder Spaltbarkeit, die Lücken an bedarfsgerechten Reagenzien füllen. Die Entwicklung und Anwendung neuer Vernetzungsreagenzien für die Proteinstrukturanalyse war das Ziel der vorliegenden Arbeit.

2 Massenspektrometrie

2.1 Massenspektrometrische Grundlagen

Mittels der MS werden die Massen intakter Moleküle oder durch Fragmentierungsreaktionen aus ihnen hervorgegangener Fragmentionen bestimmt (umfassende Literatur z.B. [18]). Dabei wird nicht die Masse direkt, sondern immer das Masse-zu-Ladungsverhältnis m/z bestimmt (Quotient der Masse des Ions in atomaren Masseeinheiten und der Ladungszahl des Ions). Um ein Massenspektrum zu erhalten werden drei Prozessschritte benötigt: Zunächst muss der Analyt in ionischer Form in die Gasphase überführt werden. Dieser Schritt wird Ionisation genannt und kann bei atmosphärischem Druck oder im Vakuum erfolgen. Für die Untersuchung von Biomolekülen ist die Verwendung sog. „weicher“ Ionisationsmethoden nötig, um die Analytmoleküle intakt zu ionisieren. Dazu werden vor allem die Matrix-assistierte-Laser-Desorptions-Ionisation (MALDI) und die Elektrosprayionisation (ESI) verwendet. Im Anschluss werden die Analytmoleküle anhand ihrer m/z -Werte in einem Massenanalysator (z.B. Ionenfalle, Flugzeit- und Quadrupolanalysator) getrennt. Die Ionen werden danach im Detektor detektiert und deren Intensität abhängig von ihrem m/z -Wert aufgezeichnet. Als klassische Detektoren dienen vor allem Sekundärionenvervielfacher. Um Strukturinformationen von Biomolekülen, wie Peptiden oder Proteinen, zu erhalten, werden zuvor selektierte Analytmoleküle gezielt fragmentiert und die Massenspektren der Fragmentionen aufgezeichnet. Meist wird dafür eine Kollisionsaktivierung (*Collision-Induced Dissociation*, CID) der Analytionen durch Stöße mit einem eingeleiteten Gas durchgeführt. Die entstandenen Fragmente werden daraufhin einer erneuten Massenanalyse und Detektion zugeführt (MS/MS) oder entstandene Fragmentionen erneut selektiert und ihrerseits erneut fragmentiert (MS³, MSⁿ).

2.2 Der Elektrospray-Prozess und die Elektrosprayionisation

1964 veröffentlichte Sir Geoffrey Taylor seine Erkenntnisse über den Zerfall von Wasserstrahlen und Wassertropfen unter Einwirkung eines elektrischen Feldes, dem sog. Elektrosprayprozess [24]. Er konnte darlegen, dass bei gewissen Bedingungen am Ende einer mit Wasser gefüllten Kapillare eine konische Ausbuchtung der Flüssigkeitsoberfläche entsteht, der sog. *Taylor-Cone*. An der Spitze dieser Ausbuchtung bildet sich ein sehr dünner Flüssigkeitsstrahl, ein sog. *Jet*, der die Oberfläche senkrecht verlässt und durch die angelegte hohe Feldstärke überschüssige Ladungsträger enthält. Dieser elektrisch geladene *Jet* zerfällt in viele gleichartig geladene Tropfen, welche eine schmale Größenverteilung aufweisen [24]. Diese zerfallen über sekundäre Prozesse (*Droplet Jet Fission*, [25]) immer weiter in kleine hoch

geladene Tropfen welche in der letzten Phase der Desolvatisation die Analytmoleküle freisetzen.

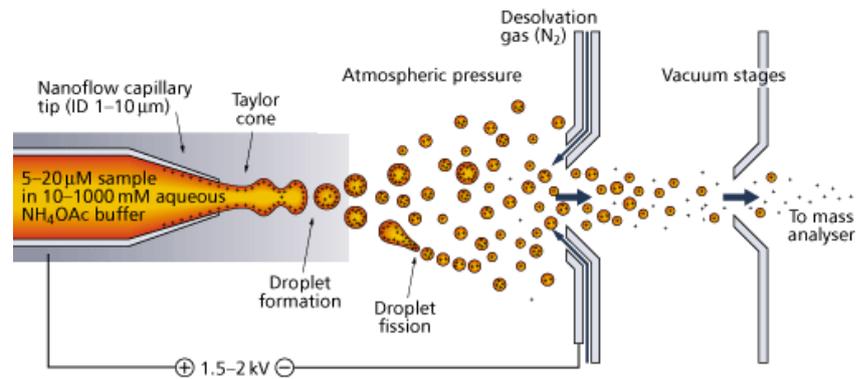


Abbildung 2 Schematische Darstellung des nESI-Sprayprozesses [26].

Die Bildung oszillierender Tropfen, die aus einem *Jet* hervorgehen, wurden bereits 1879 von Lord Rayleigh beobachtet und untersucht [27]. Rayleigh konnte zeigen, dass durch die Wechselwirkung zwischen Oberflächenspannung und der elektrostatischen Abstoßung der Oberflächenladung (*Coulomb Repulsion*) eine vom Tropfenradius und Tropfenmaterial abhängige, maximale Tropfenladung pro Radius existiert, das sog. Rayleigh-Limit (Formel 2, [28]). Wird dieses Verhältnis überschritten, lassen die sich ausbildenden Oszillationen den Tropfen in zwei kleinere Tröpfchen zerreißen. Die Gesamtladungen verteilen sich auf beide Tröpfchen, welche das Rayleigh-Limit damit wieder unterschreiten (*Coulomb Explosion*).

$$Z_R = \frac{8\pi}{e} (\gamma \varepsilon_0 R^3)^{1/2}$$

Z_R ... Anzahl der möglichen Elementarladungen (Rayleigh-Limit)
 γ ... Oberflächenspannung der Flüssigkeit
 ε_0 ... Dielektrizitätskonstante des Vakuums
 R ... Tropfenradius

Formel 2 Rayleigh- Limit

Die Elektrosprayionisation (ESI) macht sich diesen Prozess als Ionisationsmethode zu Nutze. Nachdem möglichst feine Tropfen erzeugt wurden, verlieren diese weiteres Lösungsmittel durch Verdunstung in einem ihnen entgegengesetzten trockenen Gasstrom innerhalb des beheizten Einlasses des Massenspektrometers (siehe Abbildung 2). Es entstehen winzige geladene Tröpfchen (~10 nm), die nur eines bzw. wenige Analytmoleküle enthalten. Nach fast vollständiger Desolvatisation verbleiben geladene Analytmoleküle mit wenigen angelagerten Ionen oder Lösungsmittelmolekülen (Abbildung 2). Dole zeigte schon 1968, dass mittels ESI Makromoleküle in die Gasphase überführt werden können [29] und ab 1984 wurde die Verwendung der ESI durch John B. Fenn als „sanfte“ Ionisationsmethode untersucht [30]. 1988 konnte Fenn (Chemie Nobelpreis 2002) mittels ESI zeigen, dass auch makromolekulare Biomoleküle zerstörungsfrei ionisiert und massenspektrometrisch untersucht werden können [31]. Nahezu zeitgleich wurde die zweite heute angewandte sanfte Ionisationsmethode, die

Matrix-unterstützten Laserdesorption/Ionisation (MALDI) von Hillenkamp und Karas vorgestellt [32].

Der Entstehungsmechanismus der Molekülionen in der letzten Phase des ESI-Prozesses scheint sich nach der Art bzw. dem Molekulargewicht des Analyten zu richten und ist nicht abschließend geklärt [33]. Da bei Proteinuntersuchungen in der Regel im positiven Modus gearbeitet wird, also unter Anlegen einer positiven Spannung an die Ionenquelle, handelt es sich bei den sich zuletzt noch angelagerten Ionen um Protonen oder Kationen aus dem Analyten bzw. dem Puffer, z.B. Na^+ , K^+ oder NH_4^+ [34].

Für sehr kleine Moleküle wurde der *Ion-Evaporation-Mechanismus* (IEM) von Iribarne und Thomson 1976 postuliert [35]. Dabei wird angenommen, dass sich die kleinen Moleküle zunehmend an der Tropfenoberfläche anreichern und dort in geladenem Zustand desorbieren. Für große, globuläre Moleküle, wie z.B. intakte Proteinen, wird hingegen angenommen, dass das solvatisierte Molekül im Tropfeninneren nach Verlust der Solvation eine gewisse Menge der überschüssigen Ladungsträger anlagert, der sog. *Charged-Residue-Mechanismus* (CRM) nach Dole [36]. Für die Beschreibung der Ionisation der mittelgroßen Peptide wurden weitere Modelle vorgeschlagen, welche jedoch prinzipiell dem *Ion-Evaporation-Mechanismus* näher stehen als dem *Charged-Residue-Mechanismus* (Abbildung 3). Diese werden als *Chain-Ejection-Mechanismus* (CEM) [33] und *Combined-Charged-Residue-Field-Emission-Modell* (CCRFEM) [37] bezeichnet.

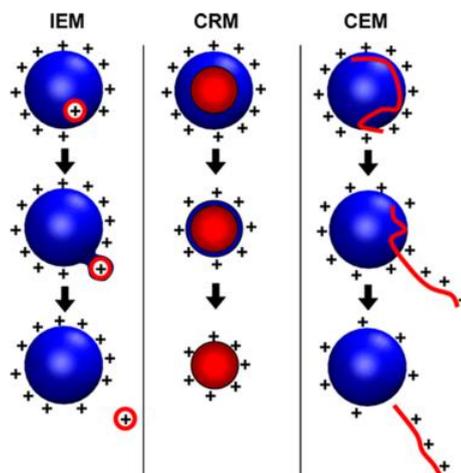


Abbildung 3 Gegenüberstellung der Ionisierung nach IEM, CRM und CEM [38].

Übliche Kapillarspannungen von mehreren kV (ca. 4kV), ein hoher Probenverbrauch und hohe Desolvatisierungstemperaturen im Einlassbereich (oftmals mehrere hundert °C) führen bei der ESI zu Redoxreaktionen in der Kapillare und starker thermischer Belastung der Analyten. Erst durch die Verwendung sehr dünner Kapillaren konnte die Kapillarspannung auf wenige kV (1,0-1,8 kV) gesenkt werden. Damit einhergehend sinkt der Probenverbrauch stark und durch

das feinere Spray kann bei sehr viel milderer Bedingungen eine sogar gesteigerte Ionisationsausbeute erreicht werden [39]. Weitere Vorteile der sog. Nano-ESI (nESI) stellen die verbesserte Toleranz des Ionisationsprozesses gegenüber nichtflüchtigen Pufferbestandteilen, v. a. Salze, und die damit einhergehende erhöhte Sensitivität auch bei geringsten Probenkonzentrationen ($\sim 10^{-6}$ M) verschiedener Analyten dar [40], [41]. Durch die sehr schonenden Ionisationsbedingungen können auch nichtkovalent stabilisierte Komplexe intakt in die Gasphase überführt und massenspektrometrisch untersucht werden [42], [43]. Weiterhin bleiben labile Modifikationen der Biomoleküle, wie posttranslationale Modifikationen, erhalten.

Die Bezeichnung „offline n-ESI“ bezieht sich auf eine spezielle Form der ESI. Dabei wird die Probe im Gegensatz zu „online“- Methoden nicht mittels einer Flüssigchromatographie in das Massenspektrometer, bzw. den Emitter, appliziert, sondern die Probe wird direkt in eine separate Kapillare gefüllt, in den Emitter eingesetzt und dann deren Inhalt (evtl. durch Anlegen eines geringen Überdruckes am Ende der Kapillare unterstützt) gesprüht. Durch Verwendung sehr dünner, spitz ausgezogener Kapillaren wird ein sehr feines Spray erzeugt (nESI). Dadurch werden die oben genannten Vorteile der nESI erreicht und gleichzeitig können sehr kleine Probemengen (wenige μL) einer Analytlösung kontinuierlich untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden selbst ausgezogene Glaskapillaren als Emitter verwendet, deren äußere Oberfläche mittels physikalischer Gasphasenabscheidung (PVD) im Argonplasma mit Gold beschichtet wurde. Diese leitfähigen Glaskapillaren wurden mit einem elektrisch-leitfähigen Dichtgummi ummantelt und in den stählernen Emitter des Massenspektrometers eingeschraubt um sie mit der Hochspannungsquelle des Emitters zu kontaktieren.

2.3 Erzeugung von Massenspektren

Im Folgenden werden die beiden Massenspektrometer der Orbitrap-Reihe, das Orbitrap Fusion Tribrid- und das Orbitrap Q Exactive Plus-Massenspektrometer der Firma Thermo Fisher Scientific, und die dazugehörigen Komponenten der Ionenoptik, Massenanalytoren und Detektoren vorgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

2.3.1 Massenanalytoren und Massendetektoren

Um das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z -Wert) von desolvatisierten Molekülionen zu bestimmen, werden in einem Massenspektrometer meist ein Massenanalytator (Trennung) und ein Massendetektor (Nachweis) kombiniert. Ursprünglich stellte der Massenanalytator eine ionenoptische Komponente dar, welche nur einen gewissen Teil des Ionenstrahls zum Detektor passieren lässt. Nur Ionen eines bestimmten m/z -Werts oder eines bestimmten m/z -Bereichs

verbleiben auf stabilen Trajektorien zum Detektor. Das Detektorsignal wird dann dieser Masse bzw. diesem Massenbereich zugeordnet, so dass ein Massenspektrum rekonstruiert wird.

Heute existieren durch die Entwicklung von Ionenfallen und Quadrupolen zwei verschiedene Lösungsansätze (neben älteren wie z.B. Sektorfeld-Geräten), die gewünschten Teile des Ionenstrahls zu isolieren und dem Detektor zuzuführen:

Zum einen kann eine lineare Geometrie gewählt werden, in der der Ionenstrahl z.B. einen Quadrupol-Massenanalysator passieren muss, so dass nur Ionen eines bestimmten m/z -Verhältnisse den Detektor erreichen. Meist wird der Ionenstrahl aber nicht direkt detektiert, sondern erst nach Durchlaufen eines zweiten Massenanalysators höherer Auflösung (z.B. Flugzeitanalysator) einem Detektor zugeführt. Da diese Anordnung mit einem sich linear ausbreitenden Ionenstrahl arbeitet, wird sie im Folgenden als „*Beam-Type*“-Anordnung bezeichnet [18]. Der zweite Ansatz nutzt die Möglichkeit, die Ionen mittels Ionenfallen „einzufangen“ (W. Paul: „Ionenkäfig“, Nobelpreis für Physik 1989). Diese Fallen werden dabei periodisch durch den Ionenstrahl gefüllt und anschließend entleert. Die eingeschlossenen Ionen können nur unter gewissen Resonanzbedingungen stabil im Inneren der Ionenfalle gehalten werden, daher werden solche Konstruktionen im Folgenden als „*Resonance-Type*“-Anordnungen bezeichnet [18]. Es können elektromagnetische [44] oder rein elektrische Ionenfallen benutzt werden [45]. Durch gezieltes Verschieben der eingestellten Resonanzbedingungen werden Ionen, abhängig von deren m/z -Verhältnis, angeregt oder ausgekoppelt. Ein separater Detektor (z.B. Faraday Becher, Sekundärionenvervielfacher) registriert den Ionenstrom der ausgekoppelten Ionen. Alternativ wird in speziell für diesen Zweck konstruierten Ionenfallen mittels Fourier-Transformation eine dem m/z -Wert zugehörige Oszillationsfrequenz der eingeschlossenen Ionen ermittelt. Anhand der ermittelten Frequenzen wird dann ein Massenspektrum rekonstruiert. Solche speziellen Ionenfallen dienen sowohl als Massenanalysator, als auch als Detektor (Ionenzyklotron- und Orbitrap-Massenanalysatoren) [46].

2.3.2 Quadrupol und ionenleitende Multipole

Der lineare Quadrupol stellt den einfachsten Vertreter einer Klasse ionenoptischer Bauelemente dar, der sog. Multipole. Sie bestehen aus einer geraden Anzahl parallel-angeordneter metallischer Stäbe mit rundem oder hyperbolischen Profil. Die Stäbe sind symmetrisch angeordnet (quadratisch beim Quadrupol) und je zwei benachbarte Stäbe weisen das entgegengesetzte Potential auf. Das Potential wird durch Überlagerung von einstellbaren Gleichspannungsanteilen und hochfrequenten Wechsellspannungsanteilen (sog. RF, Radiofrequenz) generiert [18]. Sich in z-Richtung (parallel zu den Stäben) bewegende geladene

Ionen werden innerhalb des Quadrupols abhängig vom wechselnden Potential zu den Stäben (in x- und y- Richtung) abgelenkt (Abbildung 4). Je nach Einstellung des Quadrupols und dem m/z -Wert des Ions kann sich die Auslenkung um die zentrale Achse beim Durchqueren des Quadrupols weiter erhöhen, konstant bleiben, oder erniedrigen. Die Bahnen der Ionen können demnach abhängig vom m/z -Wert instabil werden oder sogar um die z- Achse fokussiert werden.

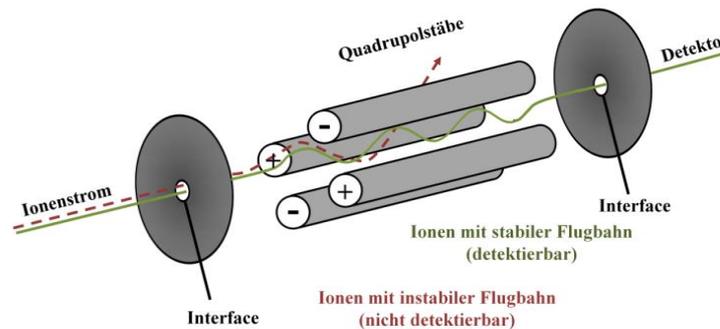


Abbildung 4 Schematische Funktionsweise eines linearen Quadrupols (mod. nach [47])

Die Bewegungsgleichungen eines geladenen Teilchens im Quadrupolfeld wurden schon 1886 von Mathieu gelöst [48] und zeigen, dass der Quadrupol als Massenfilter mit einstellbarem Transmissionsfenster, also auch als Massenanalysator, nutzbar ist.

Beim Betrieb ohne überlagerte Gleichspannung, im sogenannten *RF-only*-Modus, dient das Wechselfeld nur dem Einschluss der Ionen innerhalb des Quadrupols, so dass der Quadrupol seine massenabhängige Filterwirkung verliert und alle Ionen transmittiert werden [49]. Man spricht auch von einem Transferquadrupol [18]. Eine gebogene Konstruktion, wie z.B. der „Active Beam Guide“ innerhalb des Orbitrap Fusion-Massenspektrometers (siehe 2.3.5), ermöglicht das gezielte Umlenken eines Ionenstrahls unter Nichtbeeinflussung von Neutralteilchen, was zur Trennung von diesen führt. Die Fähigkeit, Ionenstrahlen umzuleiten und gleichzeitig zu bündeln, kann durch die Erhöhung der Stabanzahl weiter verbessert werden. Dies führt zu steileren Potentialwällen in der Nähe der Stäbe und zu einem vergrößerten inneren Bereich „flachen Potentials“ (sog. effektives mechanisches Potential von Multipolen). Mittels höherer Multipole können auch ausgedehnte Ionenstrahlen gut gehandhabt werden [18]. Bei dem Orbitrap Fusion-Massenspektrometer werden daher Oktapole in Form von „ionenleitenden Multipolen“ zum Transfer der Ionen zwischen den einzelnen Bereichen des Gerätes genutzt. Ein Hexapol dient zudem dem Einschluss der Ionen innerhalb der HCD-Kollisionszelle (siehe 2.3.5).

2.3.3 Lineare Ionenfalle

Im Gegensatz zum linearen Quadrupol durchfliegen die Ionen eine lineare Ionenfalle (*Linear Ion Trap*, LIT) nicht, sondern werden in einem zentralen Bereich der Ionenfalle gespeichert [50]. Es handelt sich um eine rein elektrische Ionenfalle. Die Konstruktionsform der linearen Ionenfalle ist von der Paul-Falle abgeleitet. Vier parallel und quadratisch angeordnete, metallische Stäbe ersetzen die zentrale Ringelektrode der Paul-Falle. Durch Dreiteilung der Stäbe dienen vorderer und hinterer Teil der Stäbe als Endkappen-Elektroden. Der zentrale Teil dient als unterbrochene Ringelektrode, in der die Ionenwolke eingeschlossen ist (Abbildung 5). Durch die offen ausgeführten „Endkappen“ können Ionen in beide Richtungen der Falle eingefüllt bzw. entlassen werden. Somit ist prinzipiell immer ein axialer Auswurf von Ionen möglich. Zudem ist ein radialer Auswurf von Ionen möglich, wenn im mittleren Segment mit einem Spalt modifizierte Elektroden verwendet werden. Diese Bauform wird in Orbitrap Massenspektrometern verwendet und dient zur Auskopplung von Ionen zu den Detektoren.

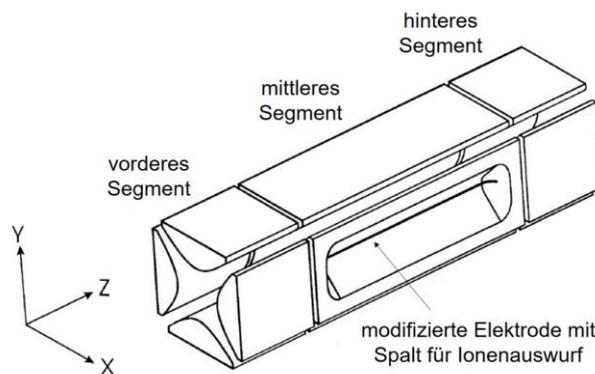


Abbildung 5 Schematischer Aufbau einer linearen Ionenfalle (mod. nach [51])

Verschiebt man die Stabilitätsbedingungen innerhalb der Falle langsam, können gezielt nacheinander verschiedene m/z -Werte ausgekoppelt werden [51]. Wenn diese Ionen mittels eines Detektors (meist mehrere Faraday-Becher) registriert werden, kann die Falle als Massenanalysator dienen. Werden die Stabilitätsbedingungen der Ionen so gewählt, dass nur ein enger m/z -Bereich in der Falle gehalten wird, erfüllt sie zusätzlich auch die Funktion eines Massenfilters.

Alternativ kann durch eine resonante Anregung der eingeschlossenen Ionen mittels eines RF-Pulses eine Stoßaktivierung mit dem Gas (Helium) erfolgen und eine kollisionsinduzierte Fragmentierung (*Collision-Induced Dissociation*, CID) innerhalb der Ionenfalle erreicht werden (*Resonance Type CID*). Von besonderer Bedeutung ist, dass gleichzeitig positive und negative Ionen im Inneren der linearen Ionenfalle gespeichert werden können. Die eingeschlossenen Ionen oszillieren aufgrund ihrer entgegengesetzten Polarität innerhalb der Falle gegenläufig. Es ist daher möglich, in der Ionenfalle Ionen-Ionen-Reaktionen

durchzuführen und deren Reaktionsprodukte zu untersuchen. Wird die lineare Ionenfalle für den gemeinsamen Einschluss von Radikalanionen mit positiven Molekülonen genutzt, kann durch eine Ionen-Ionen-Reaktion ein Elektron auf das Molekülion übertragen werden. Die Fragmentierung der gebildeten radikalischen Molekülionen wird als Elektronentransferdissoziation (ETD) bezeichnet.

2.3.4 Orbitrap-Massenanalysator

1999 wurde der Orbitrap-Massenanalysator von Makarov patentiert [52]. In einem besonderen Typ der Ionenfalle, bekannt als „orbitale Falle“ (*Orbital Trapping*), werden die Ionen um eine von Außenelektroden umgebene zentrale Spindel gesammelt. Die Elektrodengeometrie, ursprünglich 1923 mit der sog. Kingdon-Falle eingeführt [53], wurde in veränderter Form (Knight 1981, ideale Kingdon Falle) vor allem für spektroskopische Untersuchungen an Ionen genutzt [54]. Die Überlagerung eines logarithmischen und eines linearen Potentialverlaufs entlang einer spindelförmigen Elektrode führt zu einer Speicherung der Ionen in oszillierenden Bahnen entlang der Spindelachse. Anstatt aus den Rotationsfrequenzen der Ionen mittels Fourier-Transformation Massenspektren zu generieren, nutzte Makarov die überlagerte periodische Wanderung der Ionen entlang der Spindelachse- die axiale Frequenz-, um Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse der Ionen zu bestimmen. Obwohl die Orbitrap als Ionenfalle in Verbindung mit einem zweiten Detektor nutzbar ist [52], können in einem Orbitrap-Massenanalysator mittels Fourier-Transformation die Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse direkt aus der axialen Oszillationsfrequenz der eingeschlossenen Ionen bestimmt werden [55]. Durch die gleichzeitige Bestimmung der m/z -Werte aller Ionen und deren Intensität, erfüllt der Orbitrap-Massenanalysator sowohl die Aufgabe eines Massenanalysators als auch die eines Massendetektors.

Um eine möglichst freie Bewegung der Ionen entlang der Spindelachse zu gewährleisten, muss der Orbitrap-Massenanalysator unter Hochvakuum betrieben werden. Zur Injektion in den Massenanalysator werden die Ionen zunächst in einer gekrümmten Ionenfalle (*C-Trap*) gesammelt und mittels eines Pulses aus dieser wieder entlassen (Abbildung 6). Die durch die Krümmung fokussierten Ionen werden durch zusätzliche Ionoptiken (*Einzel-Linse*) weiter fokussiert und dezentral in die Orbitrap eingeschossen. Innerhalb der Orbitrap bilden sich ringförmige Ionenpakete gleicher Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse, welche entlang der Spindelachse oszillieren. Die in den Endkappen induzierten Wechselspannungen werden mittels Messverstärker ausgelesen und deren Frequenzen durch Fourier-Transformation in die Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse umgerechnet (Abbildung 6).

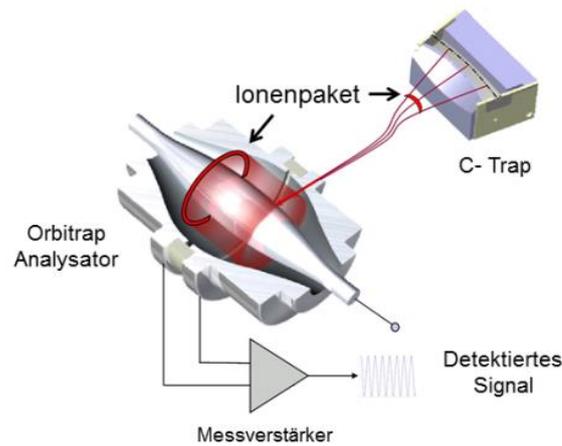


Abbildung 6 Schematische Funktionsweise des Orbitrap-Massenanalysators (mod. nach [56])

Durch verbesserte Methoden der Fourier-Transformation und der Messelektronik, als auch einer verbesserten Abstimmung der Elektrodengeometrie und der Ionenoptiken sind sehr hohe Masseauflösungen bis in den Bereich von 10^6 möglich [57]. Aufgrund der Proportionalität der Oszillationsfrequenz zur reziproken Wurzel des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses (Formel 3), erfolgt ein Abfall der Auflösung bei steigendem m/z -Wert langsamer als bei FTICR-Geräten, bei denen ein linearer Zusammenhang besteht. Durch die sequenzielle Injektion von Ionenpaketen in den Orbitrap-Massenanalysator und kurzen Messzeiten (< 250 ms) bei hoher Auflösung (> 100.000) ergeben sich besondere Eignungen des Orbitrap-Massenanalysators für die Parallelisierung von MS und MS/MS-Experimenten innerhalb des Massenspektrometers [57], [58] und somit für die Untersuchung von Proteinen, Peptiden und Cross-Linking-Produkten mittels LC-MS/MS-Experimenten.

$$\omega = \sqrt{\left(\frac{z}{m}\right) * k}$$

ω ... Oszillationsfrequenz

k ... Gerätekonstante

m ... Masse

z ... Ladung

Formel 3 Abhängigkeit der axialen Oszillationsfrequenz ω vom Masse-zu-Ladungsverhältnis m/z

2.3.5 Aufbau des Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometers

Das Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer der Firma Thermo Fisher Scientific stellt ein Hybridgerät dar, in dem zwei Masseanalysatoren, zwei Massendetektoren und drei mögliche Fragmentierungsarten zur Verfügung stehen (Abbildung 7).

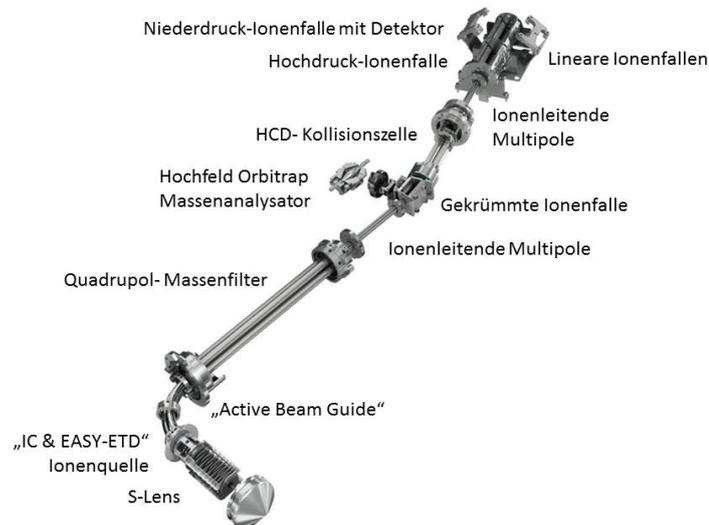


Abbildung 7 Aufbau des Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometers (mod. nach [59])

Die Ionen werden in verschiedenen Bereichen des Geräts selektiert, gesammelt, fragmentiert und detektiert. Die Baugruppen sind aufgrund der verschiedenen Arbeitsdrücke und Betriebsspannungen mittels ionenleitender Multipole verbunden, wobei das Gerät sowohl im (+)-ESI, als auch im (-)-ESI-Modus betrieben werden kann, indem die Polaritäten der Komponenten geändert werden.

Die Ionen werden aus der Quelle durch den Einlasskonus zuerst in einen speziell geformten Ionentrichter geleitet. Dieser besteht aus mehreren gestapelten metallischen Platten mit zentraler Öffnung, an denen ein radiofrequentes Wechselfeld angelegt ist, der sog. *S-Lens* [60], [61]. Dadurch werden die vorerst diffuse Bewegungsrichtung und Geschwindigkeitsverteilung der Ionen zentriert und gedämpft. Die in diesem Bereich vorhandenen Neutralmoleküle werden nicht fokussiert und entweichen durch die Spalten des Ionentrichters ins Vakuum. Durch Anlegen eines zusätzlichen elektrischen Potentials kann den Ionen Energie zugeführt werden, um die Desolvatisierung zu verbessern („*In-Source Activation*“). Hinter der *S-Lens* befindet sich eine zweite interne Ionenquelle, in der Fluoranthen mittels Glühentladung sowohl zu Radikalkationen als auch -anionen ionisiert wird [62]. Die Fluoranthen-Ionen werden dadurch dem Ionenstrom beigemischt. Diese Ionen können als interne Kalibranten dienen (*Internal Calibration, IC*) [63] oder im Falle der Fluoranthen-Radikalanionen zur Fragmentierung der Analytmoleküle mittels ETD in der LIT genutzt werden [64]. Weitere Neutralteilchen werden durch einen rechtwinkligen, in sich um 90° gedrehten Quadrupol („*Active Beam Guide*“) aus

dem Ionenstrom entfernt und dieser dann dem Quadrupol-Massenfilter zugeführt. Mittels der zentralen gekrümmten Ionenfalle (*Curved Trap*, *C-trap*) können Ionen aus dem Quadrupol oder den hinter der C-Trap liegenden Kollisionszellen bzw. Ionenfallen gesammelt und dem Orbitrap-Massenanalysator zugeführt werden.

Lässt man den Quadrupol-Massenfilter alle enthaltenen Ionen passieren, so erhält man das Massenspektrum der unfragmentierten Molekülionen („*full-scan*“, *MS*). Wird ein gewisser Massenbereich ausgewählt, können die selektierten Ionen in der HCD-Kollisionszelle („*Higher Energy Collision-Induced Dissociation*“, *HCD-MS/MS*) oder der zweigeteilten linearen Ionenfalle (*CID-MS/MS* und *ETD-MS/MS*) gesammelt und fragmentiert werden [65]. Die Stärke der Fragmentierung wird dabei über die Einstellung einer „*Normalized Collision Energy*“ (angegeben als *%NCE*) geregelt [66]. Es handelt sich dabei um keinen absoluten Wert bzw. Energieeintrag, sondern um einen vom Hersteller eingeführten prozentualen Wert, anhand dessen mittels einer internen Kalibrierung des Gerätes und des *m/z*-Wertes des Vorläuferions die nötigen elektronischen Anpassungen innerhalb der Kollisionszellen vorgenommen werden.

Die als Hexapol ausgeführte HCD-Kollisionszelle [67] kann den Ionenstrahl entweder in die lineare Ionenfalle weiterleiten oder Ionen einschließen, um sie durch Stöße mit Stickstoff-Hintergrundgas (~ 5 mbar Druck [18]) zu fragmentieren („*beam-type*“- Stoßaktivierung [68]). Die in dem Orbitrap Fusion-Gerät verwendete LIT, ist in zwei voneinander getrennte, unter verschiedenen Drücken arbeitende und jeweils mit Helium gefüllte Fallen geteilt (*Dual-Pressure Ion Trap*, Abbildung 7). Innerhalb des ersten Teils der LIT wird unter erhöhtem Druck ($\sim 5 \times 10^{-3}$ Torr [18]) eine verbesserte Speicherung der Ionen und eine erhöhte Fragmentierungseffizienz erreicht (Hochdruck-Ionenfalle). Dieser Teil wird darum zur Durchführung der Ionen-Ionen-Reaktionen mit Fluoranthen-Radikalanionen für ETD und zur Durchführung der CID („*resonance-type*“-Stoßaktivierung [69]) benutzt. Der zweite Teil der LIT wird unter niedrigerem Druck betrieben ($\sim 4 \times 10^{-4}$ Torr [18]), wodurch eine verbesserte Massenauflösung bei der Verwendung als Massenanalysator, in Verbindung mit der an ihr angebrachten Faraday-Blech, erreicht werden kann. Bei gleichbleibender Massenauflösung kann durch dieses Design eine doppelte Abtastrate (*scan rate*) erzielt werden [70]. Die Reaktionsprodukte einer Fragmentierungsreaktion können in der Ionenfalle gesammelt und erneut fragmentiert werden. Wird ein Fragmention aus einem MS/MS-Experiment einer weiteren Fragmentierung unterzogen, so handelt es sich beim erhaltenen Fragmentionenspektrum um ein MS³-Spektrum. Je nach Anzahl der sequenziellen Fragmentierungen spricht man von MSⁿ, wobei (n-1) Fragmentierungen durchgeführt wurden. Laut Hersteller sind bis zu zehn Fragmentierungen möglich [71].

3 Vernetzungsreagenzien für die Proteinstrukturanalyse

Die chemische Immobilisierung von Proteinen wird schon seit den 1950er Jahren in der Biochemie genutzt, z.B. um Antikörper zu isolieren und zu reinigen [72]. Verschiedene Strategien der chemischen Immobilisierung und die Entwicklung vielfältiger Reagenzien und Kupplungsstrategien führten 1969 zur Verwendung des ersten „homobifunktionellen aminreaktiven Quervernetzungsreagenz“ (Glutaraldehyd) [73]. Bifunktionelle Quervernetzungsreagenzien gewannen zudem zur Stabilisierung von Proteinen und Proteininteraktionen zunehmend an industrieller Bedeutung. 1992 wurde eine grundlegende Charakterisierung der Reaktivitäten und Reagenzien beschrieben [74]. Inzwischen steht eine Vielzahl von Reagenzien zur chemischen Quervernetzung von Proteinen zur Verfügung, mittels derer eine MS-basierte Ableitung von Strukturinformationen der Proteine möglich ist [46], [75]. Neben dem Einbau von unnatürlichen Aminosäuren zur Erzeugung von Quervernetzungsprodukten [76]–[80] werden vor allem bifunktionelle Quervernetzungsreagenzien verwendet, welche gesondert zur Proteinlösung gegeben werden, um die Quervernetzungsreaktion auszulösen. Zur Charakterisierung der Reagenzien unterscheidet man die Reaktivitäten der beiden Kopfgruppen und den durch das Reagenz überbrückbaren Abstand. Dazu wird die maximale Länge (*extended conformation*) des sog. „*Spacers*“ (Abstandshalter) angegeben – einer vorerst nicht näher definierten chemischen Struktur, die beide Kopfgruppen verbindet.

Welche Reagenzien im Rahmen der Proteinstrukturaufklärung bzw. der Identifizierung von Proteinbindungspartnern Quervernetzungsprodukte liefern, wird durch die räumliche Anordnung der Aminosäuren bestimmt. Eine Quervernetzungsreaktion von reaktiven Gruppen der Aminosäuren, deren Abstand die Länge des Quervernetzers übersteigt, ist nicht möglich. Die Länge des Cross-Linkers erlaubt daher die Ableitung von Abstandsinformationen der verknüpften Aminosäure-Seitenketten. Die Quervernetzer dienen als molekulares „Maßband“, dessen überbrückbare Distanz entscheidend durch die Wahl des *Spacers* bestimmt wird: Zum einen soll seine Länge die Bildung einer ausreichend hohen Anzahl an Quervernetzungsprodukten ermöglichen. Zum Anderen sind aber besonders kurze *Spacer*-Längen geeignet, um Aussagen über die räumliche Struktur der untersuchten Proteine zu erhalten (~5 Å) [81]–[88]. Da bei über 15 Å *Spacer*-Länge zunehmend Vernetzungen auftreten die keine sinnvollen Abstandsinformationen liefern, verwendet man meist Reagenzien mit 8-12 Å.

Gleichzeitig lassen sich durch die Auswahl der chemischen Reaktivität des Quervernetzers verschiedene Aminosäuren vernetzen. Die durch die Quervernetzung überbrückte Distanz wird dabei als „C_α-C_α- Abstand“ angegeben - also ausgehend von den beiden C_α- Atomen der vernetzten Aminosäuren. Die Art der quervernetzten Aminosäure, also der Abstand der reaktiven Gruppe vom C_α-Atom, und die Chemie der Quervernetzungsreaktion haben somit zusätzlichen Einfluss auf die überbrückte Distanz. Zurzeit werden vor allem Aktivester (N-Hydroxysuccinimid-Ester [89]) als reaktive Kopfgruppen genutzt, welche vorwiegend Aminogruppen (N-Termini und ε-Aminogruppen der Lysine) adressieren und eine Nebenreaktivität gegenüber Hydroxylgruppen (Serine, Threonine, Tyrosine) aufweisen [90]. Die chemischen Quervernetzungsreagenzien werden anhand ihrer Reaktivität und ihres Aufbaus in drei Gruppen eingeteilt (Beispiele in Tabelle 1):

- **Homobifunktionell** (z.B. DSS, BS³,BS²G) :

Das Quervernetzungsreagenz trägt zwei funktionelle Gruppen gleicher Reaktivität.

- **Heterobifunktionell** (z.B. SDA):

Das Quervernetzungsreagenz vereint zwei verschiedene Reaktivitäten, z.B. einen Aktivester und eine photoreaktive Gruppe.

- **Trifunktionell** oder höher funktionalisiert (z.B. BAMG):

Das Quervernetzungsreagenz trägt zwei oder mehr reaktive Gruppen sowie eine Gruppe zur Anreicherung der Quervernetzungsprodukte (z.B. Biotin, Alkin, Azid).

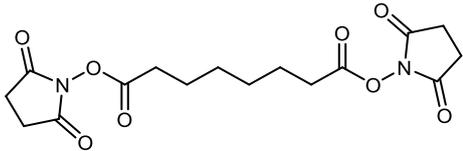
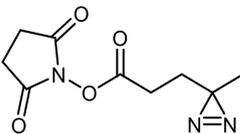
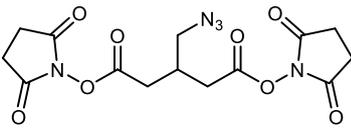
| <i>Name und Struktur des Quervernetzungsreagenzes</i> | <i>Art und Länge des Quervernetzungsreagenzes</i> |
|--|---|
|  <p>Disuccinimidylsuberat (DSS) [91]</p> | <p>Homobifunktionell</p> <p>11,4 Å</p> |
|  <p>Succinimidyl-4,4'-azipentanoat (SDA) [92]</p> | <p>Heterobifunktionell</p> <p>3,9 Å</p> |
|  <p>Bis(succinimidyl)-3-azidomethylglutarat (BAMG) [93]</p> | <p>Trifunktionell</p> <p>5,0 Å</p> |

Tabelle 1 Strukturen von ausgewählten homo-, hetero- und trifunktionellen Quervernetzungsreagenzien

Die in Tabelle 1 dargestellten Reagenzien weisen dabei die folgenden Charakteristika auf:

DSS stellt durch seine zwei aminreaktiven NHS-Ester einen homobifunktionelles Reagenz dar. SDA stellt ein heterobifunktionelles Reagenz dar, da es sowohl einen aminreaktiven NHS-Ester, als auch eine photoreaktive Diazirin-Gruppe aufweist. BAMG ist ein Vertreter der trifunktionellen Reagenzien mit zwei aminreaktive NHS-Estern und einer zentralen Azidgruppe die zur Anreicherung oder chemischen Modifikation genutzt werden kann.

Von besonderer Bedeutung ist die erstmalige Ausnutzung der Spaltbarkeit von massenspektrometrisch nicht stabilen Quervernetzungsreagenzien in der Gasphase durch Back *et al.* 2001 [94]. Bei der kollisionsinduzierten Fragmentierung von Quervernetzungsprodukten ihres *BID-Linkers* fanden Back *et al.* eine ausgeprägte Fragmentierung der zentralen tertiären, benzylierten Aminogruppe in der Gasphase unter charakteristischer Abspaltung eines Tropyliumkations (Abbildung 8). Das Tropyliumion wurde im Rahmen der Datenauswertung als sog. *Reporterion* benutzt, da es den Einbau des Quervernetzungsreagenzes in das fragmentierte Molekülion anzeigt (vgl. Kapitel 3.4.2).

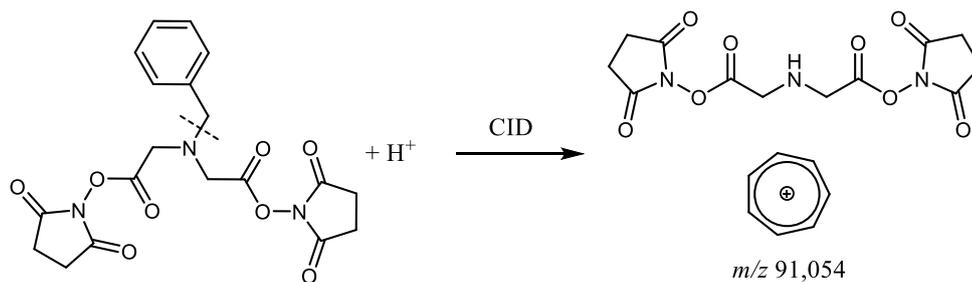


Abbildung 8 Erzeugung eines Reporterions bei Fragmentierung des *BID-Linkers*

Durch gezielten Einbau solcher massenspektrometrisch labiler Gruppen können *Labeling*- als auch Quervernetzungsreagenzien für eine vereinfachte massenspektrometrische Analyse verändert werden. Daraufhin wurden weitere Verbindungsklassen synthetisiert und genutzt, um vor allem mittels Stoßkollision (CID-spaltbar) aber auch Elektronentransferdissoziation (ETD-spaltbar) oder photolytischer Spaltung (IRMP, UV) charakteristische Fragmentionen zu erzeugen (3.4.3). Die MS-spaltbaren Quervernetzungsreagenzien („*MS-cleavable cross-linkers*“) weisen durch die Bildung charakteristischer Fragmentionen eine besondere Eignung für die MS-basierte, automatisierte Identifizierung von Quervernetzungsprodukten auf und können breit angewendet werden.

3.1 Peptidsequenzierung und Nomenklatur der Peptidfragmente

Wie in Kapitel 1 beschrieben, können Proteine anhand ihrer Spaltpeptide bzw. Peptidfragmente identifiziert werden [95]. Wird das intakte Protein mittels MS fragmentiert, spricht man von einem *Top-Down*-Ansatz [95]–[97]. Im Gegensatz dazu, steht der *Bottom-Up*-Ansatz [7], wo aus Proteinen durch enzymatische oder chemische Spaltung Peptide gebildet, mit MS identifiziert und daraus die Proteinsequenz rekonstruiert wird. Typischerweise wird eine Identifizierung mittels Datenbankanalyse durchgeführt [10]. Liegt ein proteolytisches Lysat eines Proteins vor, kann durch den Abgleich der intakten Massen der entstandenen Peptide auf das Protein zurück geschlossen werden (MS-Ebene, *Peptide Mass Fingerprint*). Darüber hinaus können anhand der Fragmentationsspektren von Peptiden Rückschlüsse auf deren Aminosäuresequenzen erhalten werden (MS/MS-Ebene, *Peptide Spectrum Matches*) [98]. Existieren keine hinterlegten Daten, muss die Peptidsequenz aus den gefundenen Fragmentationen *De-Novo* rekonstruiert werden [99], [100]. Dabei ist es hilfreich, die Anzahl an möglichen Peptiden durch die Vorgabe der Sequenzen von in Betracht zu ziehenden Proteinen zu begrenzen. Weiterhin kann die Anwendung mehrerer Fragmentierungsmethoden nötig sein, um ausreichend komplementäre Daten für eine Rekonstruktion zu erhalten [69].

Es existieren mehrere Nomenklaturen der bei der massenspektrometrischen Peptidsequenzierung auftretenden Fragmentationen [101]. Die ursprünglich von Roepstorff und Fohlmann vorgeschlagene Nomenklatur unterscheidet N-terminale und C-terminale Fragmente [102]. Fragmentiert ein einfach geladenes Vorläuferion, können bei jedem Bindungsbruch zwei komplementäre Fragmentationen entstehen, von denen jedoch nur eines geladen und damit massenspektrometrisch nachweisbar ist. Je nach Position des Bindungsbruchs entstehen die komplementären a und x, b und y, bzw. c und z-Ionen. Bei N-terminal-verbleibender Ladung (a, b, c-Ionen) wird ausgehend vom N-Terminus nummeriert, bei C-terminaler Ladung (x, y, z-Ionen) entsprechend ausgehend vom C-Terminus (Abbildung 9).

Die strikte Nomenklatur von Roepstorff und Fohlmann (erzwungener Bindungsbruch) führt jedoch bei den häufig auftretenden y-Ionen zur Notwendigkeit, formal übertragene Wasserstoffatome einzuführen und mittels des Symbols y' oder y'' zu kennzeichnen. Daher wurden vereinfachende Nomenklaturen erst von Johnson *et al.* [103] und später Biemann [104] vorgeschlagen. Im Folgenden wird die in Abbildung 9 dargestellte, vereinfachte Nomenklatur von Biemann für die Kennzeichnung von Peptidfragmenten verwendet, da sich diese allgemein durchgesetzt hat (vgl. *Methods of Enzymology* [105] bzw. *Mascot Server*, Matrix Science [106]). Obwohl die von Johnson und Biemann etablierte Nomenklatur auch Fragmente der

Seitenketten von Aminosäuren vorsieht [107], wird diese in dieser Arbeit nicht zur Kennzeichnung der Verluste von Seitenkettenfragmenten verwendet, sondern eine eigene Nomenklatur an gegebener Stelle eingeführt.

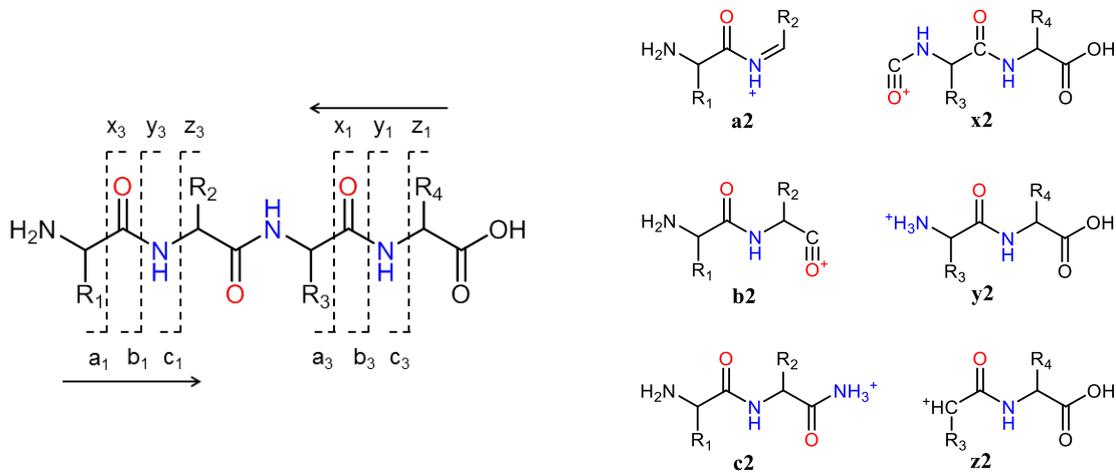


Abbildung 9 Nomenklatur der Peptidfragmente nach Roepstorff und Biemann [105].

3.2 Nomenklatur der Quervernetzungsprodukte

Um die verschiedenen möglichen Reaktionsprodukte zu charakterisieren, wurde von Schilling *et al.* 2003 [108] eine vereinheitlichte Nomenklatur für Quervernetzungsprodukte vorgeschlagen (Abbildung 10). Wenn keine quervernetzende Reaktion zwischen Reagenz und zwei Aminosäuren stattfindet, können entweder eine oder beide reaktiven Kopfgruppen hydrolysieren (oder mit Pufferbestandteilen, wie Aminen, reagieren). Falls eine Reaktion des Vernetzungsreagenzes mit zwei Aminosäuren stattfindet, muss unterschieden werden, ob diese vom selben oder aus zwei unterschiedlichen Proteinen/Peptiden stammen:

A) **Typ 0 Cross-link** (alternativ „*dead-end*“):

Einmalige Reaktion des Vernetzungsreagenzes mit einer Aminosäure. Durch Hydrolyse (oder Reaktion mit Pufferbestandteilen) der zweiten reaktiven Gruppe wird nur eine Aminosäure der Peptidkette modifiziert (Abbildung 10 A).

B) **Typ 1 Cross-link** (alternativ „*intrapeptidal*“ oder „*loop-link*“):

Zwei Aminosäuren werden durch das Vernetzungsreagenz verbrückt. Beide Aminosäuren liegen auf einem einzigen Peptid (Abbildung 10 B).

C) **Typ 2 Cross-link** (alternativ „*interpeptidal*“):

Zwei Peptide sind durch das Vernetzungsreagenz kovalent quervernetzt. Die Peptidkette mit der höheren Masse wird als α -Peptid, die mit der kleineren Masse als β -Peptid bezeichnet (Abbildung 10 C). Es muss unterschieden werden, ob die Peptide ursprünglich aus demselben oder zwei verschiedenen Proteinen stammen.

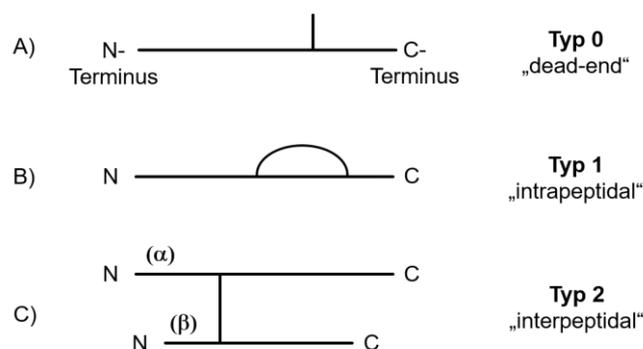


Abbildung 10 Schematische Darstellung: Quervernetzungsprodukte nach Schilling [108]

Mehrfache Modifikationen eines Peptids mit allen drei Arten von Quervernetzungsprodukten sind möglich, jedoch sind Spektren von Produkten höherer Komplexität oft nicht eindeutig zu zuordnen. Die durch multiple Modifikationen stark erhöhte theoretische Komplexität geht weit über das n^2 -Problem hinaus und wird daher meist nicht berücksichtigt. Obwohl Quervernetzungsreagenzien mit drei reaktiven Kopfgruppen beschrieben wurden, existieren bis dato nur für spezielle Software-Lösungen, um Spektren höherer Quervernetzungsprodukte automatisiert auszuwerten (vgl. [109], [110]).

3.3 Probleme der Zuordnung von Quervernetzungsprodukten

Selbst die Auswertung experimenteller Daten, welche mittels bifunktionaler Quervernetzungsreagenzien gewonnen wurden, übersteigt in ihrer Komplexität schon das n^2 -Problem, da Typ 1-Cross-links und Typ 0-Cross-links (mit H_2O und Pufferbestandteilen) zusätzlich zu den Typ 2 Cross-links in Betracht gezogen werden müssen. Die niedrig abundanten Vernetzungsprodukte müssen vor einem komplexen Probenhintergrund innerhalb kurzer Zeit möglichst vollständig sequenziert werden. Als wäre die Suche nach der „Nadel im Heuhaufen“ nicht schon diffizil genug, müssen isobare Spezies mittels MS sicher voneinander unterschieden werden. Dies bedingt zwei grundsätzliche Probleme bei der Analyse von quervernetzten Peptiden, die den Einsatz verschiedener Fragmentierungsmethoden oder die Verwendung spaltbarer Quervernetzungsreagenzien nötig machen:

1. Die ungleichmäßige Fragmentierung der Vernetzungsprodukte:

Die Fragmentierungseffizienz der Vorläuferionen sinkt bei quervernetzten Vorläuferionen höherer Massen (ab ca. 4000 Da) [111] und die verknüpften Peptidketten können ungleichmäßige Fragmentierungseffizienzen aufweisen. Oft zeigt das α -Peptid mit der höheren Masse eine bessere Fragmentierungseffizienz [112]. Daraus kann eine schlechte Sequenzabdeckung des β -Peptids resultieren. In diesem Fall, kann neben der Aminosäuresequenz des α -Peptids noch die Masse des β -Peptids bestimmt werden, wobei die

Position der Quervernetzung nicht eindeutig ermittelt wird. Während die Identität der kurzen, unzureichend sequenzierten Peptidkette bei einfachen Proben (Einzelpoteine oder wenig interagierende Proteine) anhand dieser Peptidmasse zumeist noch richtig zugeordnet werden kann, führen bei komplexen Proben isobare Peptide bei Proteom-weiter Suche zu zahlreichen „falsch-positiven“ Zuordnungen [113].

2. Das „Folgesequenzen“- Problem:

Enthält eine Peptidkette zwei reaktive Aminosäuren, so können neben intrapeptidalen Vernetzungsprodukten vom Typ 1 (Reaktion beider Aminosäuren) auch hydrolysierte Produkte vom Typ 0 entstehen (Reaktion einer Aminosäure und Hydrolyse der zweiten reaktiven Gruppe des Quervernetzungsreagenz). Liegt außerdem zwischen den beiden reaktiven Aminosäuren eine proteolytische Spaltstelle, können ausgehend von der Aminosäuresequenz eines Peptids zwei verschiedene aber isobare Produkte entstehen:

Möglichkeit 1: Wird der intrapeptidale Cross-link (Typ 1) proteolytisch gespalten, entsteht ein Typ 2 Cross-link (zwei neue Peptidketten), wobei ein Molekül Wasser durch die Proteolyse angelagert wird.

Möglichkeit 2: Das Typ 0 Cross-link Produkt (Reaktion mit Wasser) wird nicht vollständig proteolytisch gespalten („*Missed Cleavage*“). Durch die einseitige Hydrolyse des Quervernetzungsreagenz ist dennoch ein Molekül Wasser angelagert.

Nur bei sehr guter Sequenzabdeckung und dem Auftreten charakteristischer Fragmentionen können beide Fälle unterschieden werden, da sie ansonsten viele Fragmentionen teilen [114].

3.4 Identifizierungsstrategien von Quervernetzungsprodukten

Obwohl Probengemische (mit und ohne vorangegangene Proteolyse) zum Auffinden von Quervernetzungsprodukten herangezogen werden können [115], wird üblicherweise im Rahmen eines „Bottom-Up“-Ansatzes nach Proteolyse der vernetzten Proteine und anschließender chromatographischer Trennung der Produkte gearbeitet [81]. Durch flüssigkeitschromatische Auftrennung wird die Komplexität der Probe reduziert und die anschließende Tandem-massenspektrometrische Analyse der eluierten Spezies erlaubt die Detektion von Vernetzungsprodukten mit hoher Sensitivität (LC-MS/MS).

Es existieren zwei Strategien, Quervernetzungsprodukte massenspektrometrisch zu identifizieren: Die Erste basiert auf der Identifizierung der Quervernetzungsprodukte anhand des Massenspektrums aller Moleküle ohne weitere Fragmentierung (LC-MS). Die Zweite beruht auf der gezielten Selektion von Vorläuferionen aus diesem Massenspektrum und deren

anschließender Fragmentierung (LC-MS/MS). Eine Analyse nur anhand der Masse der Molekülonen ist für komplexe Proben nicht zweckmäßig, da erst eine Fragmentierung Sequenzinformationen der Peptide und die Identität der quervernetzten Aminosäuren liefern kann. Dennoch können schon auf MS-Ebene erste Hinweise erhalten werden, die auf Quervernetzungsprodukte hindeuten. Ist die Komplexität der Probe gering und sowohl Auflösung als auch Massengenauigkeit der MS-Analyse hoch genug, kann durch den Vergleich der gefundenen hochgenauen Masse und der theoretisch berechneten Masse der Reaktionsprodukte auf das Vorliegen von Quervernetzungsprodukten geschlossen werden [116]. Auch bei der Analyse komplexer Proben mittels LC-MS/MS müssen für die Auswertung eine stetig wachsende Anzahl potentieller Quervernetzungsprodukte berücksichtigt werden (n^2 -Problem, vgl. Formel 1) und eine automatisierte Auswertung ist nur mittels zunehmend aufwändigerer statistischer Analyse möglich.

Verwendet man für die Quervernetzungsreaktion Gemische isotoopenmarkierter und unmarkierter (z.B. deuterierter und undeuterierter) Reagenzien, können gezielt charakteristische Isotopenmuster in die Signale der Molekülonen von Quervernetzungsprodukten eingeführt werden. Die gedoppelten bzw. verschobenen Signale können durch die bekannte Massendifferenz einfach im Massenspektrum identifiziert werden [117]. Da die charakteristischen Muster innerhalb des Massenspektrums eine gezielte Selektion von Vorläuferionen für die anschließende Fragmentierung erlauben („*Targeted Mass Difference*“), werden isotoopenmarkierte Reagenzien häufig im Rahmen von LC-MS/MS-Experimenten verwendet [118], [119]. Werden das markierte und unmarkierte Quervernetzungsprodukt selektiert und mittels Tandem-Massenspektrometrie untersucht, kann neben der Sequenzierung durch den Vergleich der Fragmentionenspektren die Quervernetzungsposition (meist) bestimmt werden. Ist die Massendifferenz der Markierung klein, kann mittels Koisolation eine gemeinsame Fragmentierung beider Spezies in nur einem Fragmentionenspektrum erfolgen. Die Identifizierung der Isotopenmuster ist jedoch im Gegenzug bei derart kleinen Massendifferenzen durch die Überlagerung von natürlichen Isotopenmustern und Markierungsmuster nicht immer möglich. Die Verwendung von isotoopenmarkierten Reagenzien findet generell breite Anwendung für Quervernetzungs- als auch Labeling-Experimente und ermöglicht eine in hohem Maße automatisierte Auswertung der massenspektrometrischen Daten.

Alternativ zur Isotoopenmarkierung wurden MS-spaltbare Quervernetzungsreagenzien entwickelt, deren Spaltungsmuster zur vereinfachten Identifikation von Quervernetzungsprodukten genutzt wird. Erst nach der Anregung dieser Reagenzien in der Gasphase werden durch die Fragmentierung des Reagenzes charakteristische Reporterionen

oder Muster der Fragmentationen gebildet. Die Anwendung von MS-spaltbaren Quervernetzungsreagenzien ist daher auf LC-MS/MS-Experimente beschränkt. Die bei MS-spaltbaren Quervernetzungsreagenzien entstehenden Muster im MS/MS können zur automatisierten Identifizierung von Quervernetzungsprodukten genutzt werden. Sie können auch zur Selektion der durch Fragmentierung des spaltbaren Quervernetzungsprodukts entstandenen, modifizierten Peptidketten dienen, welche dann für weitere gezielte Fragmentierungsexperimente (LC-MS³) zur Verfügung zu stehen [120].

3.4.1 Isotopenmarkierung der Vernetzungsreagenzien

Da die reaktiven Kopfgruppen der Quervernetzungsreagenzien im Rahmen der Reaktion abgespalten bzw. verändert werden, sind isotopenmarkierte Quervernetzungsreagenzien üblicherweise nur im Bereich des *Spacers* durch stabile Isotope modifiziert. In Abbildung 11 ist einer der ersten und bis heute verwendeten Vertreter eines deuterierten, homobifunktionellen, aminreaktiven Quervernetzungsreagenzes dargestellt: das Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat (BS²G) [117].

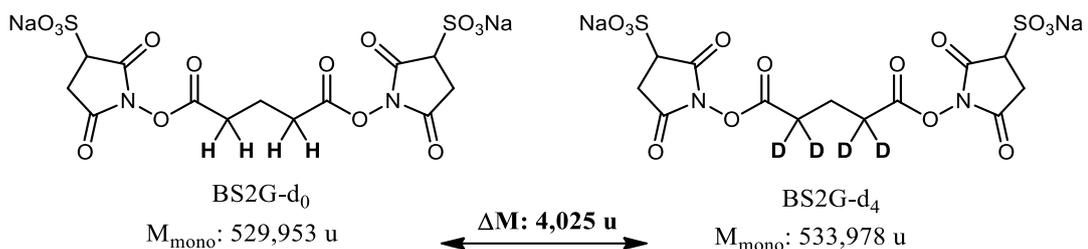


Abbildung 11 Isotopenmarkiertes (deuteriertes) Quervernetzungsreagenz BS²G

Durch die vierfache Deuterierung (d₄) ergibt sich eine um 4,025 u erhöhte Masse gegenüber der undeuterierten Variante (d₀). Wird das Isolationsfenster für ein anschließendes Fragmentierungsexperiment breit genug gewählt, können beide Spezies koisoliert werden und gemeinsam einer Fragmentierung unterzogen werden. Es entsteht ein Fragmentationenspektrum, welches Signale mit ~4 u -Dubletts für alle mit Reagenz modifizierten Spezies zeigt. Jene Fragmentationen, welche das Quervernetzungsreagenz nicht mehr enthalten stellen unmodifizierte Fragmente der Peptidketten dar [13]. Der Abgleich ob Fragmentationen modifiziert oder unmodifiziert gefunden werden ermöglicht oft die Identifizierung der Quervernetzungsstelle.

Je nach Länge des *Spacers* kann eine unterschiedliche Zahl an Deuterierungen eingeführt werden. Ein Überlappen der natürlichen Isotopenmuster mit dem Deuterierungsmuster kann so, vor allem bei hohen Ladungszuständen, vermieden und die Identifizierung von Vernetzungsprodukten vereinfacht werden. Jedoch kann bei großen Masseunterschieden nicht

mehr sinnvoll koisoliert werden, sondern beide Spezies werden nacheinander fragmentiert. Zudem zeigt sich mit zunehmenden Deuterierungsgrad eine starke Verschiebung der Retentionszeit [121]. Der große isopenkinetische Effekt der Deuterierung (Verdoppelung der Masse vom Protium zum Deuterium) führt zur früheren Elution der deuterierten Spezies. Oft kann die verzögerte Elution der Reagenzien in Kauf genommen werden. Auch wurden höher deuterierte Reagenzien (d6, d8, d10, d12) mit verschiedenen Reaktivitäten [119], [122]–[124] sowie spezialisierte Software zur Datenauswertung beschrieben [125]. Zudem existieren Ansätze, mit Deuterium markierte Quervernetzungsreagenzien zur Quantifizierung von Quervernetzungsprodukten zu nutzen [126]–[128], da somit eine Isotopenmarkierung im Rahmen der Kultivierung von Zellen (bei Verwendung unmarkierter Quervernetzungsreagenzien) unterbleiben kann [129]. Die Isotopenmarkierung (im *Spacer*) verändert weder die Reaktivität noch die Selektivität des Quervernetzungsreagenzes. Bei ansonsten gleichen Reaktionsbedingungen kann also die Wirkung einzelner Einflussfaktoren auf die Ausbeute an Quervernetzungsprodukten vergleichend untersucht werden. Durch gemeinsame Probenaufbereitung und massenspektrometrische Messungen von markierter und unmarkierter Variante wird die Störanfälligkeit der Quantifizierung dabei zusätzlich verringert, wobei die auftretenden Retentionszeitverschiebungen in der Analyse berücksichtigt werden müssen [130].

Isotopenmarkierungen am Kohlenstoffgerüst [110], [131], [132] oder an Heteroatomen wie z.B. Sauerstoff [133] lösen das Problem der Retentionszeitverschiebung, werden jedoch nur selten in Quervernetzungsreagenzien eingebaut. Breitere Anwendung finden diese Markierungsstrategien hingegen zur Modifikation der Proteine/Peptide [134], [135]. Im Rahmen der wässrigen Proteolyse werden nachträglich eingeführte ¹⁸O-Markierungen zur Unterscheidung zwischen Typ 0- und Typ 2-Quervernetzungsprodukten genutzt [133], [136]–[138]. ¹⁵N-markierte Proteine werden z.B. zur Unterscheidung zwischen Intra- und Interprotein-Quervernetzungen bei multimeren Proteinkomplexen [139], [140] und zur Untersuchung von durch Quervernetzung verursachten Strukturänderungen eingesetzt [141].

3.4.2 Hochgenaue Masse und Massendefekt

1954 legte Beynon dar, dass bei ausreichend hoher Massengenauigkeit die elementare Zusammensetzung von Molekül- und Fragmentionen berechnet werden kann [142]. Dadurch können aus massenspektrometrischen Daten Strukturinformationen organischer Moleküle gewonnen werden. Ist neben der Nominalmasse auch die exakte Masse einer Verbindung bekannt, kann für eine molekulare Masse bis ca. 500 u eine Elementzusammensetzung zugeordnet werden [143]. Die dazu nötige Genauigkeit der Massenbestimmung liegt im

Bereich von $\sim 0,001$ u (hochgenaue Masse). Daraus ergibt sich eine hohe Anforderung an die Massenauflösung des verwendeten Massenanalysators (hochaufgelöste Masse ab ca. 30.000 u, und ultra-hochaufgelöste Masse ab ca. 100.000 u molekularer Masse nötig), sodass üblicherweise FTICR Geräte (Auflösungsvermögen $\sim 10^6$ - 10^7) oder Orbitrap-Analysatoren (Auflösungsvermögen $> 10^5$) verwendet werden. Die Verwendung derart hoher Auflösungen erlaubt zudem die Basislinienauflösung der Isotopenpeaks sehr großer Massen (ca. 150 kDa bei Antikörpern [144]) und die Bestimmung der Isotopenfeinstruktur (siehe unten).

Bis auf ^{12}C , weisen alle Atome nicht-ganzzahlige Massen auf, da die atomare Masseneinheit 1u als 1/12 der molekularen Masse des ^{12}C -Isotops definiert ist. Die dem echten Wert nächste ganzzahlige Massenzahl des häufigsten Isotops wird als die Nominalmasse des Elements definiert; für zusammengesetzte Verbindungen werden die Nominalmassen der Bestandteile addiert. Die Abweichungen der exakten Masse von der Nominalmasse betragen, je nach Element, zwischen ca. +0,01 u und -0,1 u (Tabelle 2).

| Element | Isotop | atomare Masse [u] | Massendefekt | rel. Häufigkeit [%] |
|--------------------|------------------|-------------------|--------------|---------------------|
| Wasserstoff | ^1H | 1,00783 | 0,00783 | 99,99 |
| | ^2H | 2,01410 | 0,01410 | 0,01 |
| Kohlenstoff | ^{12}C | 12,00000 | 0,00000 | 98,93 |
| | ^{13}C | 13,00335 | 0,00335 | 1,07 |
| Stickstoff | ^{14}N | 14,00307 | 0,00307 | 99,63 |
| | ^{15}N | 15,00011 | 0,00011 | 0,37 |
| Sauerstoff | ^{16}O | 15,99491 | -0,00509 | 99,76 |
| | ^{18}O | 17,99916 | -0,00084 | 0,21 |
| Phosphor | ^{31}P | 30,97377 | -0,02623 | 100 |
| Schwefel | ^{32}S | 31,97207 | -0,02793 | 94,93 |
| | ^{34}S | 33,96787 | -0,03213 | 4,29 |
| Brom | ^{79}Br | 78,91834 | -0,08166 | 50,69 |
| | ^{81}Br | 80,91629 | -0,08371 | 49,31 |
| Iod | ^{127}I | 126,90447 | -0,09553 | 100 |

Tabelle 2 Massendefekte einiger ausgewählter Isotope nach Sleno et al. [145]

Die Größe dieser *massenspektrometrischen Massendefekte* ist durch die willkürliche Wahl des Bezugspunktes (^{12}C -Atom) festgelegt, sodass für Verbindungen mit sich wiederholenden chemischen Gruppen (z.B. CH_2 -Gruppen bei Alkanen) abweichende Bezugssysteme dazu führen können, dass sich bestimmte Molekülklassen in Bereichen mit identischem Massendefekt gruppieren und somit leichter identifiziert werden können [146]. Jedoch kann im Fall von aus 20 proteinogenen Aminosäuren zusammengesetzten Peptiden kein einfaches gemeinsames Bezugssystem verwendet werden [147]. Zudem führt die relative Häufigkeit der schweren Isotope, vor allem des ^{13}C , zu einer Überlagerung mehrerer Signale verschiedener Isotopenzusammensetzung des selben Peptids [148].

Die Entstehung dieser sog. *Isotopologe* führt für Peptide ab ~2 kDa dazu, dass der höchst abundante Peak in etwa alle 1,5 kDa um ~1 Da nach oben verschoben wird (*isotopic shift*) [149] bis er ab ~15 kDa nicht mehr detektierbar ist [150]. Die Bestimmung der monoisotopischen Masse von Peptiden/Proteinen kann daher ab einigen kDa nur unter Berücksichtigung der statistischen Häufigkeit der im Protein enthaltenen Elemente oder in Näherung erfolgen [149], [151], [152]. Für eine Identifikation von Peptiden und Quervernetzungsprodukten anhand der Messung von hochgenauen Massen kommt erschwerend hinzu, dass benachbarte Isotopenpeaks zusätzlich aus einer Überlagerung, meist nicht aufgelöster Isotopologe (*Isotopenfeinstruktur*) bestehen, da deren Massenunterschied nur wenige mDa beträgt (z.B. zwei ^{13}C vs. ein ^{13}C und ein ^{15}N vs. ein ^{34}S) [153]. Erst bei Verwendung hochgenauer Massenauflösung können diese kleinen Massenunterschiede dennoch zur Unterscheidung und Quantifizierung von Peptiden genutzt werden [154].

Theoretische Untersuchungen durch Mann zeigten jedoch, dass Peptidmassen nicht beliebig verteilt auftreten – wodurch prinzipiell nur eine Auswahl an Signalen im Massenspektrum untersucht werden muss [155]. Zubarev *et al.* zeigten zudem, dass eine verbindende Darstellung von Massendefekt und der Verschiebung des höchst abundanten Isotopenpeaks geeignet ist, um zwischen verschiedenen Modifikationen und Arten von Proteinen zu unterscheiden [156]. Die für eine Nominalmasse möglichen Peptide gruppieren sich um zentrale Massewerte, die ungefähr durch $n * 1,000458$ berechnet werden können, wobei n eine positive ganze Zahl darstellt [157]. Es existiert zwischen zwei aufeinanderfolgenden Verteilungen ein Bereich, in dem keine Peptidmassen gefunden werden [158]. Dieser Bereich wird mitunter als „verbotene Zone“ bezeichnet und kann benutzt werden um „Nicht-Peptide“ von der massenspektrometrischen Analyse auszuschließen [159]. Interessant ist, dass die Lage innerhalb einer Verteilung Rückschlüsse auf die Zusammensetzung des Peptids bzw. einer Peptidmodifikation zulässt [160]. Spengler *et al.* schlugen schon 2004 vor, Abweichungen von dieser Verteilung zur Identifikation von posttranslationalen Modifikationen (^{18}O -Einbau während der Proteolyse, Disulfidbrücken, Phosphorylierungen) [161] oder der Sequenzierung [157] des Peptids zu nutzen. Besonders Phosphorylierungen können durch den hohen Massendefekt der Phosphatgruppe (-70,31 mDa) direkt identifiziert werden [162]. Dieser Ansatz kann bei einfacher Phosphorylierung und einer Massengenauigkeit von 1 mDa für Peptide bis zu einer Masse von ~1 kDa genutzt, aber auch zur statistischen Analyse komplexer Datensätze herangezogen werden [163]–[165].

Ein weiterer Ansatz zur Identifizierung von Peptidmodifikationen besteht darin, entstehende charakteristische Fragmentationen, sog. *Reporterionen*, dieser Modifikationen zu nutzen. Essentiell für diesen Ansatz ist das Vorliegen eines spezifischen Fragmentions mit einer

einzigartigen Masse und zudem eine Massenbestimmung mit einer Genauigkeit von < 40 mDa [166]. Dies liegt in der Größenordnung der Anforderung an eine hochgenaue Massenbestimmung mit derer Lysin und Glutamin unterschieden werden können (Massendifferenz von 36,4 mDa). Untersucht man Modifikationen mit hohem Massendefekt, bedingt zumeist dieser Massendefekt selbst eine Verschiebung der Reporterionen in eine genügend weit entfernte „verbotene Zone“, um zweifelsfrei identifiziert werden zu können [167]. Dies erklärt, warum vor allem jodierte und bromierte Reagenzien zur Derivatisierung [147], [168]–[171] und Peptidsequenzierung [172]–[174] genutzt werden. Dabei kommt den bromierten Reagenzien eine besondere Bedeutung zu, da sie neben einem ausgeprägten Massendefekt (~ -82 mDa) eine charakteristische Isotopenverteilung aufweisen: Die Massendifferenz der nahezu gleichhäufigen Bromisotope beträgt ~ 2 Da und der relative Massendefekt zwischen den Isotopen ist mit ~ 2 mDa sehr klein.

3.4.3 Massenspektrometrisch-spaltbare Vernetzungsreagenzien

MS-spaltbare Vernetzungsreagenzien können eingesetzt werden, um das Folgesequenzen-Problem und das der ungleichmäßigen Fragmentierung der Peptidketten (vgl. Kapitel 3.3) zu lösen [111]. Durch die Spaltung während der massenspektrometrischen Analyse werden mit Cross-Linker-Fragmenten modifizierte, lineare Peptidketten freigesetzt. Somit können beide Peptide unabhängig voneinander fragmentiert und sequenziert werden. Entweder werden dazu die entstandenen modifizierten Peptide erneut selektiert und fragmentiert (MS³-Ansatz) [120], [175], [176] oder die entstandenen Fragmente werden gemeinsam aktiviert (z.B. *beam-type* CID, HCD, MS/MS-Ansatz) und in einem Spektrum ausgewertet [177], [178]. Da nur die linearisierten Peptide identifiziert werden müssen, verkleinert sich der quadratische Suchraum (n^2 -Problem) im Rahmen der Auswertung zu einem linearen Suchraum ($2n$ -Problem) [179].

Eine Unterscheidung zwischen Typ 0- und Typ 2-Produkten im Rahmen des Folgesequenzen-Problems ist aufgrund der freigesetzten Peptide leicht möglich, da ein Typ 0-Produkt nur eine modifizierte Peptidkette aufweist; ein Typ 2-Produkt hingegen zwei komplementäre modifizierte Peptidketten [180].

Zur Erzeugung der Fragmente innerhalb der massenspektrometrischen Analyse kommen verschiedene Spaltstellen des Quervernetzungsreagenz in Frage. Die größte Gruppe der zurzeit genutzten Reagenzien enthält eine zentrale heterolytische Spaltstelle die kollisions-induziert fragmentiert (Tabelle 21). Spaltstellen, die radikalisch induziert fragmentieren, werden hingegen bisher wenig oder in Kombination mit zusätzlichen heterolytischen Spaltstellen genutzt [181]–[183]. Auch die photoinduzierte Spaltung von Quervernetzungsprodukten ist in der praktischen Ausführung derzeit noch ein Randphänomen [184], [185]. Eine besondere

Klasse stellen Reagenzien dar, die unter Stoßaktivierung homolytisch fragmentieren und somit im Rahmen der nicht-radikalischen Aktivierung radikalische Fragmente erzeugen. Diese homolytisch spaltbaren Reagenzien erzeugen Fragmentationenspektren, die kollisionsinduzierte Spaltungen und sich anschließende radikalinduzierte Fragmentierungsprozesse verbinden [186], [187].

Exemplarisch wird im Folgenden die historische Entwicklung der Harnstoff-Spaltstelle nachgezeichnet und die Entstehung des Massendubletts bei der Fragmentierung von (Thio-)Harnstoffen dargestellt. Danach werden die durch Kollisionsaktivierung homolytisch spaltbaren Gruppen dargestellt, wobei ein besonderer Fokus auf die Entwicklung der TEMPO-basierten Reagenzien gelegt wird. Beide Spaltstellen werden in den in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien genutzt.

3.4.3.1 Heterolytisch spaltbare Reagenzien

Am Beispiel eines der ersten CID-MS/MS-spaltbaren Quervernetzungsreagenzes, SuDP [188], wird im Folgenden das Prinzip der Anwendung MS-spaltbarer Reagenzien beschrieben:

SuDP ist ein homobifunktionelles, aminreaktives Vernetzungsreagenz mit einer zentralen Aspartat-Prolin-Bindung. Diese, in der Gasphase sehr labile, Bindung wird nach Anregung bevorzugt gespalten [189], [190]. Die leichte Spaltbarkeit resultiert aus der Nachbarschaft der Aminogruppe des Prolins (hohe Gasphasenbasizität der Aminogruppe) und der sauren Seitenkette des Aspartats, sodass die erleichterte Protonierung des Amidstickstoffs eine Spaltung der Amidbindung zwischen diesen Aminosäuren begünstigt. Nach der Fragmentierung des Linkers werden die zuvor vernetzten Peptide mit zwei Modifikationen, einer charakteristischen Massendifferenz von ~100 u detektiert (Abbildung 12).

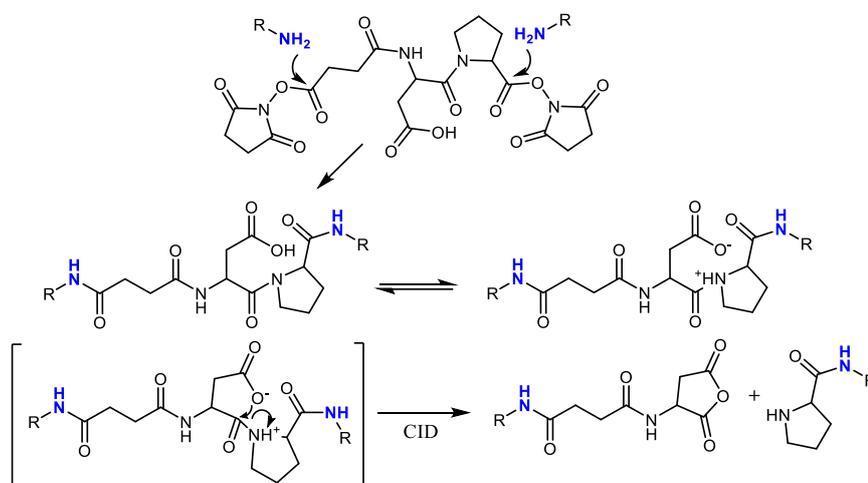


Abbildung 12 Bildung und CID-Spaltung des SuDP-Quervernetzungsprodukts [188]

Da es sich um ein unsymmetrisches Reagenz handelt, werden im Rahmen der Quervernetzungsreaktion Produkte mit beiden Orientierungen des Reagenzes aufgefunden. Diese isobaren Spezies werden während der massenspektrometrischen Fragmentierung als Vorläuferionen gleichen m/z -Wertes koisoliert und gemeinsam fragmentiert. Es können also sowohl das α - als auch das β -Peptid mit beiden Modifikationen im Fragmentionenspektrum aufgefunden werden. Dies äußert sich durch ein charakteristisches Dublett für jedes einzelne Peptid mit leichter und schwerer Modifikation. Zudem ist immer das leichte Fragment des einen Peptids zum schweren des anderen Peptids komplementär - ihre Massen ergeben zusammen die Masse des Vorläuferions. Obwohl die Peptidmassen zunächst unbekannt sind, kann anhand der charakteristischen Massendifferenz der leichten und schweren Modifikation gezielt nach den Signalen der modifizierten α - und β -Peptide gesucht werden. Diese ergeben nach rechnerischem Abzug der Massenmodifikation die Massen der quervernetzten Peptide. Somit kann anhand des Spektrums eine Plausibilitätsprüfung durchgeführt werden (Abbildung 13, oben). Ein zufälliges Auffinden von zwei Signalen mit der gesuchten Massendifferenz der Modifikationen wird durch das Fehlen der komplementären Signale des hypothetischen zweiten Peptids angezeigt, wobei im Prinzip die Masse des zweiten Peptids schon aus der Masse des Vorläuferions und einem Fragmentdublett des ersten Peptids abgeleitet wird.

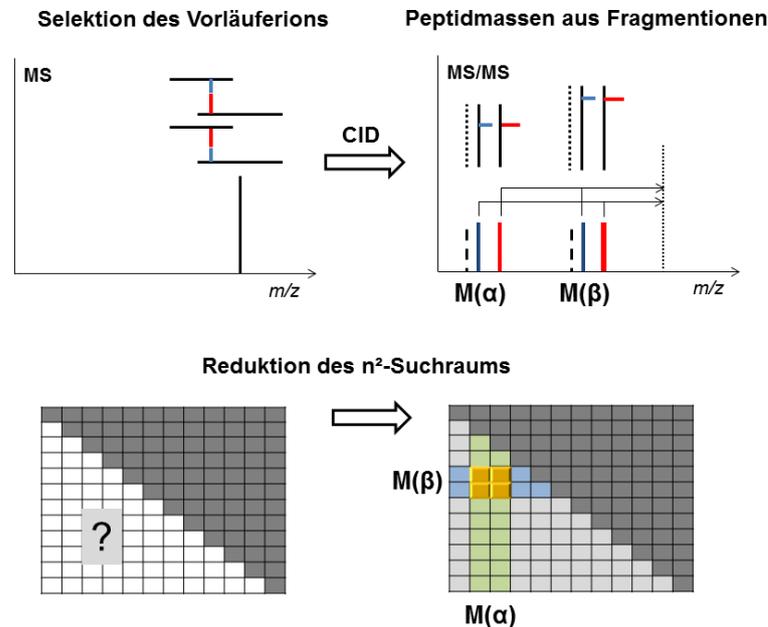


Abbildung 13 Peptidmassenbestimmung und Suchraumreduktion durch erzeugte Dubletts

Eine automatisierte Datenauswertung kann somit mit hoher Sicherheit ein Spektrum als Quervernetzungsprodukt identifizieren, wenn mehrere (z.B. drei) der charakteristischen Fragmente gefunden werden. Gleichzeitig ermöglicht die Bestimmung der intakten Peptidmassen anhand der charakteristischen Massendifferenz der erzeugten Modifikationen eine Eingrenzung des Suchraums. Bei genügend genauer Bestimmung der Peptidmassen

müssten nur noch Paare isobarer Peptide berücksichtigt werden, so dass der quadratische Suchraum in vielen Fällen nahezu linearisiert oder sogar noch stärker reduziert wird (Abbildung 13, unten).

Wie am Beispiel von SuDP gezeigt wurde, können die an den Einzelpeptiden verbleibenden Spaltfragmente als charakteristische Massenmodifikation der markierten Peptide detektiert werden. Neben der leicht-spaltbaren Asp-Pro-Gruppe wurden verschiedene Spaltstellen in Quervernetzern genutzt. Eine Auswahl der eingesetzten Reagenzien samt ihrer Spaltstellen ist in Tabelle 21 (Anhang) dargestellt. Die Reagenzien sind anhand ihrer Funktionalität klassifiziert und anhand der zeitlichen Reihenfolge ihrer Erwähnung in der Literatur angeordnet. Es handelt sich bei allen Reagenzien um mindestens bifunktionelle NHS-Ester, wobei einige noch eine dritte Funktionalität zur Anreicherung tragen.

3.4.3.2 Die Entwicklung der Harnstoffspaltstelle

Die Entwicklung von Quervernetzungsreagenzien mit labilen Spaltstellen hat die Erzeugung der gewünschten Linker-Fragmente in hoher Intensität zum Ziel. Eine zusätzlich erhöhte Spaltbarkeit der N-terminalen Peptidbindung des Prolins wurde 2010 mit dem „*Edman-Linker*“ erreicht [191] (Tabelle 21, Anhang). Dazu wurde ein, auch beim Edman-Abbau genutzter, Thioharnstoff [192] (Abbildung 14 A) mit einem Gly-Pro-Gly-Peptidfragment kombiniert (Abbildung 14 B). Da N-terminal mit Thioharnstoff modifizierte Peptide eine besonders leichte Spaltbarkeit der zum Thioharnstoff C-terminalen Peptidbindung zeigen, wird die „Edman-Chemie“ auch zur massenspektrometrischen Peptidsequenzierung benutzt [193], [194]. Die Entwicklung des Edman-Linkers nutzt diese Eigenschaft aus und liefert die gewünschte Spaltung an der labilen C-terminalen Gly-Pro-Peptidbindung. Unter Freisetzung eines C-terminalen Pro-Gly-Fragments und eines N-terminalen Thiazolon-Fragments entsteht eine charakteristische Massendifferenz der Fragmente von 30,044 u (Abbildung 14 C), wobei das Thiazolon-Fragment auch vollständig als Neutralverlust der Masse 184 u abgespalten werden kann.

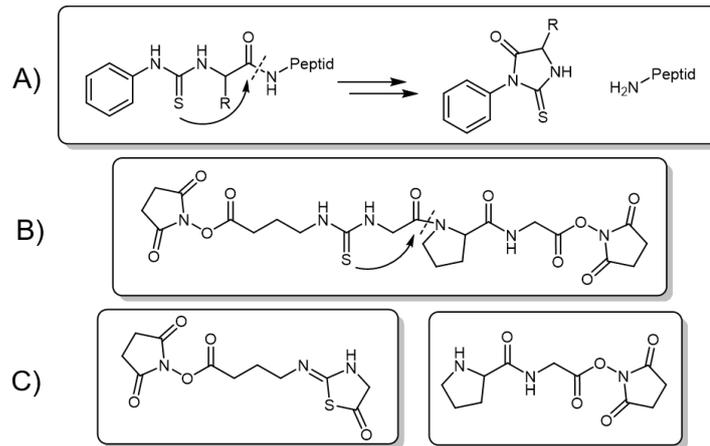


Abbildung 14 Edman-Abbau und MS-spaltbarer „Edman-Linker“

- A) Edman Abbau der N-terminalen Aminosäure als Phenylthiohydantoin-Derivat
 B) Edman- Linker mit zentralem Thioharnstoff und labiler Gly-Pro-Bindung
 C) Primäre Spaltprodukte des Edman- Linkers

Die Produktionenmassenspektren wiesen jedoch weitere, unerwartete, Spaltprodukte in Kombination mit verschiedenen Neutralverlusten auf. Vor allem die für den Edman-Abbau eingeführte Thioharnstoff-Gruppe erwies sich unerwartet als CID-MS/MS-spaltbar (Abbildung 15 A). Auch das symmetrische Thioharnstoff-Reagenz „BuTuBu“ zeigte eine ausgeprägte Spaltbarkeit (Abbildung 15 B) [195]. Die Substitution des Thioharnstoffs mit einem Harnstoff lieferte das Harnstoff-Reagenz „BuUrBu“ (Abbildung 15 C). Auch dessen zentraler Harnstoff zeigt eine ausgeprägte Spaltbarkeit, welche zur Bildung charakteristischer Dubletts mit einer Massendifferenz von ~26u führt. Zusätzlich werden je nach Art des Quervernetzungsprodukts (Typ 0, 1, 2) charakteristische Neutralverluste durch Bruch der aus den NHS-Estern geknüpften Amidbindungen beobachtet (Abbildung 15 C) [196].

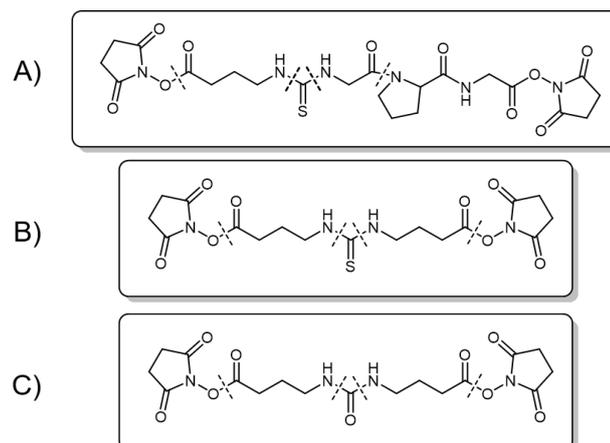


Abbildung 15 Aus dem Edman Linker abgeleitete Spaltstellen von BuTuBu und BuUrBu

- A) Spaltstellen des Edman-Linkers
 B) Spaltstellen des Thioharnstoff- Reagenz BuTuBu
 C) Spaltstellen des Harnstoff-Reagenz BuUrBu

Für das Quervernetzungsreagenz „BuUrBu“ (auch Disuccinimidyl-dibutyl-harnstoff, DSBU) und seine verkürzten Analoga ist die kollisionsinduzierte Fragmentierung der zentralen, disubstituierten Harnstoffgruppe gut untersucht [30]. Die kollisionsinduzierte Spaltung der Harnstoffgruppe wird für die automatisierte Datenanalyse von Quervernetzungsprodukten in vielfältiger Weise genutzt [179], [197]. Die Harnstoffspaltung für N-terminal modifizierte Peptide wurde schon 2001 beobachtet und als Fragmentierung des Harnstoffs in ein intermediäres Isocyanat und ein nachgewiesenes Amin gedeutet [198]. Die charakteristische Spaltbarkeit der Harnstoffgruppe hängt nicht von der Länge der gebundenen Kohlenstoffkette ab, sodass davon ausgegangen werden kann, dass alle Harnstoff-haltigen Quervernetzungsprodukte eine kollisionsinduzierte Spaltbarkeit unter Ausbildung des charakteristischen Dubletts einer Massendifferenz von 25,979 u aufweisen (Abbildung 16).

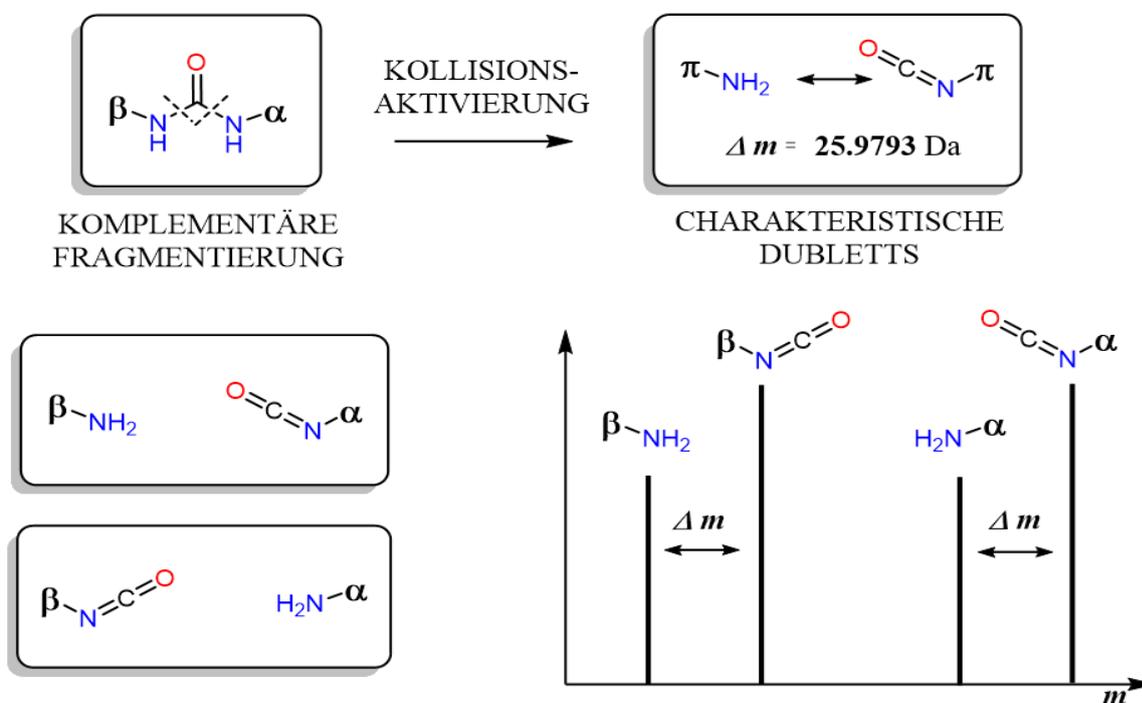


Abbildung 16 Charakteristisches „Massendublett“ nach Spaltung eines disubstituierten Harnstoffs

3.4.3.3 Homolytisch spaltbare Reagenzien

Im Gegensatz zu den heterolytisch spaltbaren Quervernetzungsreagenzien, deren Spaltung zwei Spezies mit geradzahlgiger Elektronenkonfiguration erzeugt („closed shell“), entstehen bei einer homolytischen Spaltung zwei radikalische Fragmente ungeradzahlgiger Elektronenkonfiguration („open shell“). Diese können durch die Übertragung des Radikals innerhalb des Fragmentions zusätzliche radikalische Fragmentierungen auslösen. Radikalische Fragmentierungsmethoden werden für die Peptidsequenzierung verwendet, da sie häufig komplementäre Sequenzinformationen erzeugen und labile posttranslationale Modifikationen intakt belassen [199]. Im Besonderen ermöglichen einige radikalische Fragmentierungen die

Unterscheidung isobarer Aminosäuren (Leucin - Isoleucin, Aspartat – Isoaspartat), welche ansonsten massenspektrometrisch unmöglich ist [200].

Die radikalische Fragmentierung stellt dabei im Gegensatz zur kollisionsinduzierten Fragmentierung einen nicht-ergodischen Prozess dar, findet also statistisch und in einem Nicht-Gleichgewichts-Zustand statt [201], [202]. Eine radikalische Fragmentierung von Peptiden wird durch die Einwirkung eines zuvor separat erzeugten Radikalüberträgers (*Electron Transfer Dissociation, ETD*) [203] oder eine direkte Elektronenübertragung (*Electron Capture Dissociation, ECD*) [204] auf das Molekülion ausgelöst. Während für FT-ICR-Massenspektrometer häufig das ECD-Verfahren benutzt wird [205], kann für das hier verwendete Orbitrap Fusion-Massenspektrometer ETD als Fragmentierungstechnik unter Ausnutzung des gleichzeitig als internen Massenkilibranten genutzten Fluoranthens eingesetzt werden [206]. Um eine Radikalübertragung mit hinreichender Ausbeute zu ermöglichen, müssen Radikalüberträger und Analyt ion gegenseitlich geladen sein. Die Übertragungseffizienz steigt in guter Näherung quadratisch mit der Molekülladung [201], [202], [204]. Durch die Interaktion der beiden Ionen entsteht ein radikalischer Analyt ion mit einer um eine reduzierte Ladungszahl, welches im Anschluss fragmentiert. Hieraus ergeben sich mehrere Schwierigkeiten beim Einsatz der ETD für die Peptidsequenzierung:

- A) Niedrig geladene Peptidkationen können nicht untersucht werden. Ist das Analytmolekül unzureichend geladen, sinkt die ETD-Effizienz drastisch. Für ein einfach geladenes Analyt ion ist das Reaktionsprodukt neutral, also nicht im Massenspektrometer nachweisbar. Die Ladungsreduktion führt zudem zu einer verschlechterten sekundären Fragmentierung [207]–[209].
- B) Durch eine generell geringere Fragmentierungseffizienz als bei kollisionsinduzierten Methoden muss die Intensität des Analyt ions vor der Fragmentierung hinreichend hoch sein.
- C) Die Konstruktion eines ETD-fähigen Massenspektrometers erfordert die Erzeugung, Transmission und Speicherung von Ionen entgegengesetzter Ladung in ausreichend hoher Intensität. Zudem müssen beide Spezies ausreichend lange in Kontakt kommen, um eine Reaktion zu ermöglichen.

Alternativ können die zu untersuchenden Peptide mit bestimmten Reagenzien derivatisiert werden, welche nach Stoßaktivierung ein (meist) ungeladenes radikalisches Fragment abspalten, wobei eine Radikal-tragende Gruppe am Peptid verbleibt [210]. Durch den Radikaltransfer mischen sich radikalisch erzeugte Fragmente in das kollisionsinduzierte Fragmentationenspektrum, so dass komplementäre Strukturinformationen innerhalb eines Spektrums erhalten werden. Zudem tritt gewöhnlich keine Ladungsreduktion auf und bei

hinreichend labiler Spaltstelle tritt eine nahezu vollständige Fragmentierung des Reagenzes unter kompletter Umwandlung des Analytens in eine radikalisch-aktivierte Spezies auf. Dieser Ansatz wird als „*free radical induced peptide sequencing*“ (**FRIPS**) bezeichnet [186].

Es bestehen mehrere Möglichkeiten, Peptidradikale zu erzeugen. Neben der Erzeugung durch Metallionen [211], [212], werden Salpetersäureester [213], [214], Nitrosoverbindungen [215] und Peroxid-basierende Aktivester benutzt [210] (Abbildung 17). Die verwendeten Reagenzien hinterlassen nach Abspaltung eine unmodifizierte Aminosäure. Der Ort der Modifikation kann dabei nicht rekonstruiert werden.

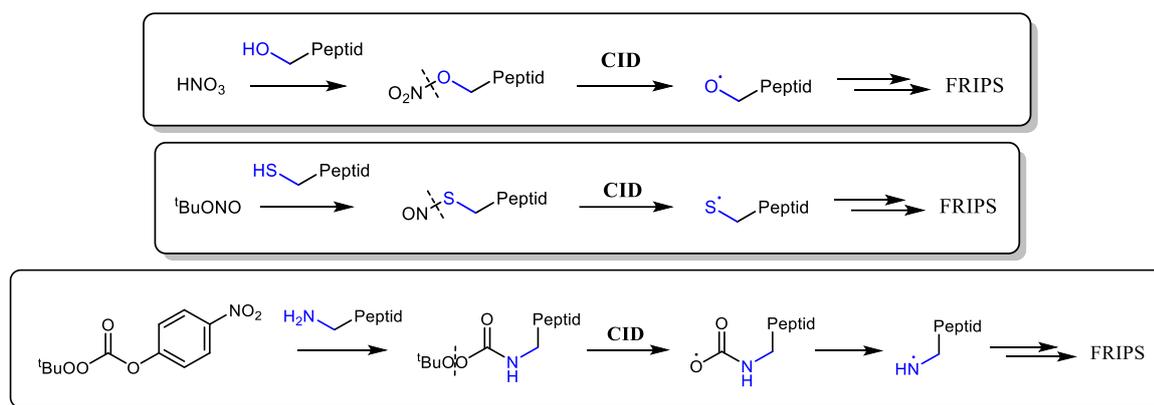


Abbildung 17 Reagenzien zur Erzeugung von Peptidradikalen (mod. nach [187])

Aufbauend darauf wurden aminreaktive NHS-Ester von Azoverbindungen [186] und TEMPO-basierten N-Oxiden entwickelt [216], welche nach Aktivierung eine Acetylgruppe an der modifizierten Aminosäure hinterlassen (Abbildung 18 A und B). Durch die Verwendung von benzylischen N-Oxiden wird die Spaltung des Nitroxids erleichtert (Entstehung eines Benzylum-Radikals). Mittels Substitution am Benzolring kann die am Peptid verbleibende Modifikation variiert werden [174], [217] (Abbildung 18 C).

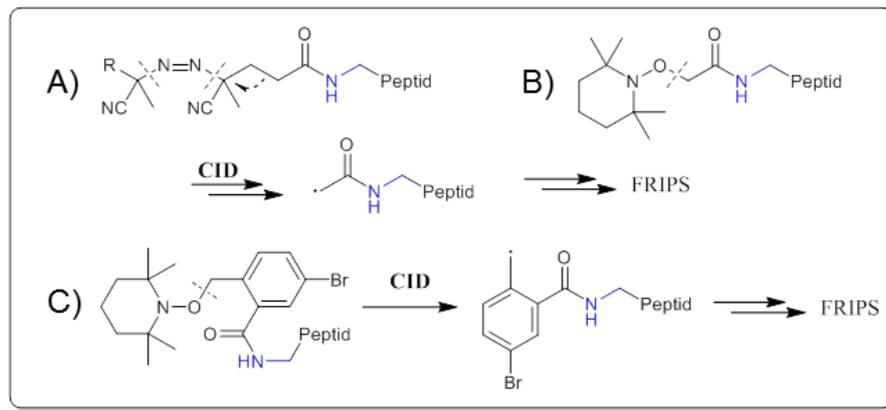


Abbildung 18 Derivatisierungen einer Aminogruppe zur Erzeugung radikalischer Modifikationen

A) Azogruppe [186]

B) TEMPO-basiertes N-Oxid [216]

C) TEMPO-basiertes, bromiert-, benzylisches N-Oxid [174]

Untersuchungen an den erzeugten Peptidradikalen zeigten die für ECD/ETD- Experimente übliche Spaltung von Disulfiden [218]. Auch die Derivatisierung von Phosphorylierungen [219] und freien Cysteinen [220] zu photoaktivierbaren Radikal-erzeugenden Gruppen wurde für FRIPS-basierte Peptidsequenzierungen genutzt. Posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen und Sulfatierungen können mittels FRIPS-(-)-ESI-MS/MS-Experimenten erfolgreich identifiziert werden [221].

Obwohl verschiedene FRIPS-Reagenzien zur Verfügung stehen, um Peptide zu modifizieren, wurden nur wenige bifunktionelle, homolytisch spaltbare Quervernetzungsreagenzien entwickelt. Für die symmetrisch spaltbare Azo-Gruppe wurde 2013 ein NHS-basierter bifunktionaler Aktivester beschrieben und zur Quervernetzung von nicht-wässrigen Peptidlösungen verwendet [222]. 2017 wurde ein symmetrischer Azo-basierter, homobifunktionaler Imidoester mit verbesserter Löslichkeit und dessen Anwendbarkeit für wässrige Peptidlösungen dargestellt [223]. Das einzige, auch in dieser Arbeit verwendete, zurzeit bekannte Nitroxid-basierte homobifunktionelle Quervernetzungsreagenz (Tempo-Bz-Cross-linker, vgl. Kapitel 3.5.2) wurde 2015 beschrieben und dessen Fragmentierungsverhalten nach Quervernetzung von wässrigen Peptidlösungen mittels (+)-ESI-CID-MS/MS untersucht [224].

3.5 Beschreibung der verwendeten Vernetzungsreagenzien

Im Folgenden sollen die vier in dieser Arbeit verwendeten Vernetzungsreagenzien und ihre Anwendungsmöglichkeiten kurz vorgestellt werden.

3.5.1 N,N'-Carbonyldiimidazol

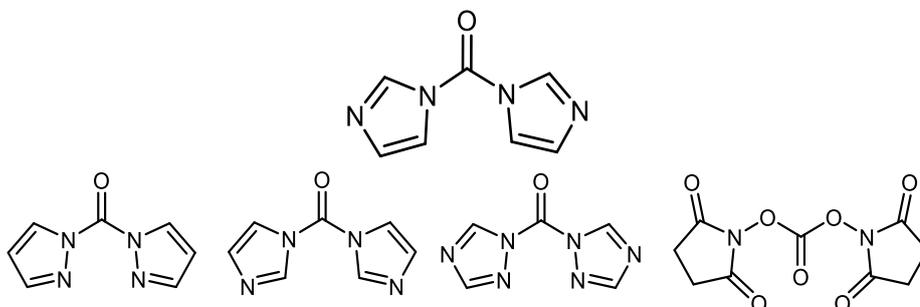


Abbildung 19 Struktur von N,N'-Carbonyldiimidazol (oben) und Analoga (unten).

N,N'-Carbonyldiimidazol (CDI) wurde erstmals 1956 von Heinz A. Staab im Rahmen seiner Arbeiten über Azolide synthetisiert [225]. Der von Staab geprägte Begriff Azolide bezeichnet diese spezielle Klasse heterozyklischer Amide, in deren Sinne Diazolide als heterozyklische Harnstoffe aufgefasst werden können. Je nach Art des verknüpften Heterozyklus werden mitunter beachtliche Reaktivitäten festgestellt, welche sogar den Acylhalogeniden überlegen sein können. In Analogie zu den bekannten Aktivestern könnten Azolide also durchaus als „Aktivamide“ bezeichnet werden, wobei sich nach Reaktion mit einem geeigneten Nukleophil dieselben Reaktionsprodukte bilden. Von „besonderer Bedeutung für die synthetischen Anwendungen der Azolide“ ist vor allem das N,N'-Carbonyldiimidazol, welches „den meist verwendeten Vertreter“ der Azolide darstellt [226] (Abbildung 19, oben).

Carbonyldiimidazol wird benutzt, um Carbonsäuren in aktivierte Imidazolide zu überführen oder um hydrolyse stabile Carbamate und Harnstoffe aus Alkoholen und Aminen aufzubauen [227]. Von besonderem Vorteil sind die milden Reaktionsbedingungen und das Auftreten ungiftiger Reaktionsprodukte (CO₂, Imidazol) verglichen mit Reagenzien vergleichbarer Reaktivität wie z.B. Phosgen [228]. Primär gebildete Imidazolide hydrolysieren als aktivierte Intermediate bei Wasserkontakt unter Rückbildung der eingesetzten Carbonsäuren, Alkohole oder Amine unter Imidazol- bzw. CO₂-Abspaltung. Daher führen nur umgesetzte Azolide zu (hydrolyse-)stabilen Reaktionsprodukten.

Die Rückbildung der nicht umgesetzten Edukte erfolgt, abgesehen von freigesetztem Imidazol und CO₂, spurlos. Vor allem der Aufbau von Harnstoffen aus Aminen, bzw. Carbamaten aus Aminen und Alkoholen durch CDI erscheint besonders nützlich, da dadurch ein Aufbau aus Isocyanaten oder Chloroformiaten vermieden werden kann. Da ausschließlich die zentrale CO-

Gruppe des CDI in das Produkt integriert wird, reagiert CDI formal nur als Carbonylüberträger, bzw. als aktivierte Kohlensäure. Werden mittels CDI harnstoffartige Quervernetzungen direkt aus den Amino- und Hydroxy- Gruppen der Proteine erzeugt, können diese ähnlich genutzt werden wie die spaltbaren Harnstoffgruppen der bifunktionellen, CID-MS/MS-spaltbaren Quervernetzer wie z.B. DSBU (vgl. Kapitel 3.4.3.2). Da hydrolysierte Reaktionsprodukte (Typ 0) direkt zerfallen, entstehen nur Typ 1- und Typ 2-Quervernetzungsprodukte. Die gebildeten Harnstoffe und Carbamate sind durch Kollisionsaktivierung spaltbar und bilden die für die Harnstoffspaltstelle charakteristischen Dubletts. Mit der zentralen Carbonylgruppe als *Spacer* und seiner bifunktionellen Kopfgruppe stellt CDI den kürzesten verfügbaren MS-spaltbaren, homobifunktionellen Quervernetzer dar [229].

3.5.2 TEMPO-Bz-Cross-Linker (TEMPO-Bz-Linker)

Die Verwendung von Kollisions-induzierten und Elektronentransfer-basierten Fragmentierungsmethoden liefert komplementäre Sequenzabdeckungen von Peptiden. Da die Realisierung einer ETD-basierten Peptidfragmentierung technisch aufwändig ist und nur eine geringe Fragmentierungseffizienz aufweist, wurden mehrere Konzepte erarbeitet, um eine radikalische Fragmentierung von Peptiden mittels Radikal- erzeugenden *Labeling*-Reagenzien zu erreichen. Ausgangspunkt war die Verwendung von monofunktionellen Reagenzien, die sowohl eine reaktive Kopfgruppe für die Biokonjugation, als auch eine labile, Radikal-erzeugende chemische Struktur aufweisen (vgl. Kapitel 3.4.3.3). Dies führte zur Entwicklung des sog. FRIPS – „*Free Radical-Induced Peptide Sequencing*“ [186]. Durch die Kollisionsaktivierung des modifizierten Peptids wird zum einen das Peptid durch Stoßaktivierung fragmentiert und zum anderen das modifizierende Reagenz in ein freies und ein am Peptid gebundenes Radikal gespalten. Durch Radikalübertragung innerhalb der Peptidkette können radikalische Bindungsbrüche auftreten, wie sie im Rahmen der ETD beobachtet werden. Es kann eine gemischte Fragmentierung erreicht werden, so dass neben kollisionsinduzierten Fragmenten auch radikalische Fragmente auftreten. Somit wird ausschließlich mittels Stoßaktivierung eine Überlagerung beider Fragmentierungsarten in einem Experiment erreicht und es werden informationsreichere Fragmentationenspektren erhalten.

Das Prinzip der Peptidmodifizierung wurde zu einem bifunktionellen Quervernetzungsansatz weiterentwickelt: Die labile, Radikal- generierende Gruppe fungiert als MS-Spaltstelle und mittels der zusätzlichen, radikalisch-generierten Fragmentionen kann die Qualität der Peptidsequenzierung verbessert werden. Durch Modifizierung einer bekannten Nitroxid-

generierenden, monofunktionellen Verbindung (TEMPO-Bz) [217] mit einem zweiten NHS-Ester wurde der TEMPO-Bz-Linker erhalten [224] (Abbildung 20).

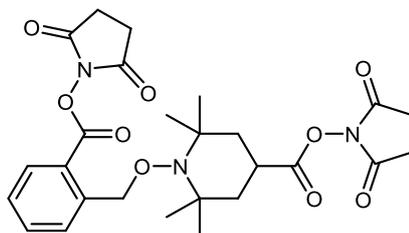


Abbildung 20 Chemische Struktur des TEMPO-Bz-Linkers

3.5.3 Brom-Urea-Cross-Linker (BrPU-Linker)

Um mit dem Quervernetzer modifizierte Peptide schon anhand des m/z -Wertes der Molekülionen zu identifizieren, werden isotoopenmarkierte Quervernetzungsreagenzien eingesetzt (vgl. Kapitel 3.4.1). Wird ein Isotopenmuster mit genau der Massedifferenz der Markierung aufgefunden, können beide Vorläuferionen gemeinsam fragmentiert werden. Da die Fragmentierung der Peptidketten von der Isotopenmarkierung des Quervernetzers unabhängig ist, werden die mit Quervernetzer modifizierten Fragmentionen als Dublett mit dieser charakteristischen Massendifferenz detektiert. Durch diese Technik ist sowohl eine Auswahl der Vorläuferionen mittels der charakteristischen Isotopenmuster als auch eine zweifelsfreie Identifizierung der modifizierten Peptidfragmente möglich. Es stehen zurzeit einige deuterierte, spaltbare Quervernetzungsreagenzien zur Verfügung, jedoch führt ein hoher Deuterierungsgrad der Reagenzien zu Retentionszeitverschiebungen während der flüssigchromatographischen Trennung (vgl. Kapitel 3.4.1). Dem gegenüber stehen nur wenige Quervernetzungsstrategien, die isotoopenmarkierte Heteroatome verwenden. Meist werden dazu im Rahmen der enzymatischen Proteolyse der Reaktionsprodukte ^{18}O -Atome im C-Terminus der proteolytisch gebildeten Peptide eingebaut oder Modifikationen an den N-Terminus der Peptide angefügt (vgl. Kapitel 3.4.2). Es existieren zudem nur wenige Alternativen zu ^{13}C -isotoopenmarkierten Quervernetzungsreagenzien (z.B. TATA- $^{12}\text{C}_3/^{13}\text{C}_3$ [110], DSA- $^{12}\text{C}_6/^{13}\text{C}_6$ [230], vgl. auch [131], [132]).

Durch die natürliche Isotopenverteilung der Elemente (v. a. durch ^{13}C verursacht) ergibt sich mit zunehmender Peptidmasse eine immer stärker verbreiterte Verteilung der massenspektrometrischen Signale eines Peptids (vgl. Kapitel 3.4.2). Dies führt bei Isotopenmarkierungen niedriger Massendifferenz zu einer Überlagerung der natürlichen und der eingeführten Isotopenmuster. Daher wurde versucht, Heteroatome mit charakteristischen Isotopenmustern für die Markierung zu verwenden. Weist die Markierung zudem einen hohen Massendefekt auf, kann dieser genutzt werden, um Quervernetzungsprodukte anhand ihrer

hochgenauen Masse zu identifizieren (vgl. Kapitel 3.4.2). Durch das natürliche Isotopenmuster von Brom, welches 50,69% ^{79}Br und 49,31% ^{81}Br enthält (Tabelle 2), liegt bei Verwendung eines bromierten Quervernetzungsreagenz ein charakteristisches Isotopenmuster vor, bei dem die Isotopenpeaks den ungewöhnlichen, massendefizienten Abstand von ~ 2 u aufweisen. Zudem weist Brom einen der höchsten Massendefekte aller Elemente von ~ -80 mu auf (Tabelle 2) und eignet sich daher für eine Identifizierungsstrategie, die auf der Bestimmung der hochgenauen Masse der Vorläuferionen basiert.

Die Vorteile eines MS-spaltbaren Quervernetzungsreagenz sollten daher mit der natürlichen Isotopenmarkierung durch Bromatome und deren Massendefekten vereint werden. Dazu wurde das zweifach bromierte Harnstoff-basierte Reagenz *BrPU-Linker* verwendet (Abbildung 21). Das charakteristische Isotopenmuster der doppelten Bromierung und der hohe Massendefekt des Reagenzes sollten eine Identifikation von Quervernetzungsprodukten auf MS-Ebene ermöglichen. Die zusätzliche Spaltbarkeit der zentralen Harnstoffgruppe lieferte ein charakteristisches Dublett mit einer Massendifferenz der Spaltfragmente von 25.979 u im MS/MS. Da nach der Harnstoffspaltung einfach bromierte Fragmente entstehen, veränderte sich das Isotopenmuster während der massenspektrometrischen Analyse gravierend und die modifizierten Spaltfragmente der Peptide waren anhand des Brom-Isotopenmusters zweifelsfrei zu identifizieren. Durch das natürliche Isotopenmuster besteht keine Notwendigkeit künstlich-isotopenmarkierte Reagenzien einzusetzen. Außerdem ist eine Retentionszeitverschiebung in der Umkehrphasenchromatographie nicht zu erwarten.

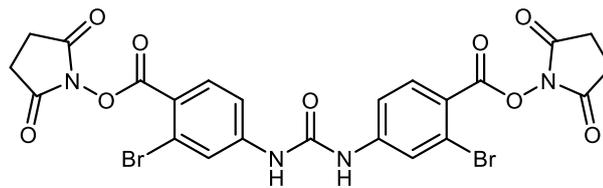


Abbildung 21 Chemische Struktur des *BrPU-Linkers*

3.5.4 Imidodicarbonsäurediimidazol-Cross-Linker (IDDI-Linker)

Da mittels des hochreaktiven CDI aus den Aminosäureseitenketten Harnstoffe und Carbamate aufgebaut werden können, lag es nahe, eine erweiterte bzw. verlängerte Version des CDI auf Azolidbasis zu erproben. Da CDI keinen klassischen Spacer besitzt, wurde versucht vom Bis-Imidazolid des Ammoniaks, dem Imidodicarbonsäurediimidazol, als Grundkörper einer solchen Klasse von Reagenzien auszugehen. Grundidee war die Beibehaltung einer Harnstoffartigen Spaltbarkeit des Reagenzes. Da die zentrale Imidgruppe bei Reaktion mit Amid- oder Hydroxylen zur Bildung von Biuret-artigen bzw. Allophansäureester-artigen Reaktionsprodukten führt, wird die analoge Bildung von Harnstoffen und Carbamaten durch CDI imitiert. Naheliegender war, dass gebildete Biuret-Derivate durch ihre symmetrische Struktur (gespiegelter Harnstoff) auch die bekannten Harnstoff-Fragmente der vernetzten Reaktionspartner bilden können. Zudem wäre die überbrückbare Distanz des Reagenzes erhöht. Beträgt der N-N'-Abstand in CDI nur 2,6 Å, so ist der analoge Abstand im IDDI mit 5,0 Å fast verdoppelt.

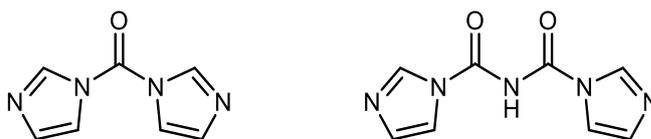


Abbildung 22 Struktur von CDI (links) und Imidodicarbonsäurediimidazol (IDDI, rechts)

Entgegen der Reaktivität des CDIs findet bei der Hydrolyse eines Typ 0-Quervernetzungsprodukts keine vollständige Rückbildung der freien Aminosäure statt. Es ist nach Decarboxylierung von einer verbleibenden Carbamoylierung der Aminosäure auszugehen. Auch wenn damit ein großer Vorteil des CDIs entfällt, ermöglicht die Decarboxylierung dennoch die Vermeidung von falsch-positiven Zuordnungen der Reaktionsprodukte. Durch die Decarboxylierung des hydrolysierten Typ 0-Produkts wird das oben geschilderte „Folgesequenzen“-Problem umgangen (vgl. Kapitel 3.3). Zudem bietet die Verwendung von Biuret- statt Harnstoff-Spaltstellen die Möglichkeit einer chemischen Modifizierung des zentralen N-Atoms des Biurets. Somit könnte unabhängig vom weiteren Aufbau eines Reagenzes innerhalb der Spaltstelle selbst eine Trifunktionalität des Reagenzes eingebaut werden.

Da nach Kenntnis des Autors keine vorherigen Arbeiten über Quervernetzungsstudien mittels Biuret-basierten Reagenzien vorliegen, sollten vor allem die Fragmentierungseigenschaften der Biuret-Spaltstelle(n) untersucht werden.

4 Materialien und Methoden

4.1 Chemikalien

| | | |
|--|---------------------------------|--------------------------|
| Acetonitril (HPLC <i>gradient grade</i> , HiPerSolv) | | VWR |
| Acrylamid Lösung 40% (w/v) (19:1) | | Merck |
| Ameisensäure (HiPerSolv, Chromanorm) | FA | VWR |
| Ammoniumhydrogencarbonat | ABC | Sigma-Aldrich |
| Ammoniumpersulfat | APS | Sigma-Aldrich |
| Bis(trichlormethyl)carbonat | | Sigma-Aldrich |
| Coomassie Brillantblau R250 | | Sigma-Aldrich |
| Celite 532 | | Carl Roth |
| Dimethylsulfoxid | DMSO | Carl Roth |
| Dithiothreitol | DTT | Applied Chem |
| Essigsäure | AcOH | Carl Roth |
| Ethanol | EtOH | Merck |
| Desoxycholsäure, Natriumsalz | DOC | Carl Roth |
| Dimethylsulfoxid, trocken (über Molsieb 4 Å) | DMSO | Sigma-Aldrich |
| Dioxan | | Grüssing GmbH |
| Glycerol | | Org. Laborchemie |
| Harnstoff | | Carl Roth |
| 4 M HCl in Dioxan | | Alfa Aesar |
| Salzsäure 0,1M (endotoxinfrei) | | Sigma-Aldrich |
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure | HEPES | AppliChem |
| Iodacetamid | IAA | Sigma-Aldrich |
| Imidazol | | Merck |
| Pyrazol | | Merck-Schuchardt |
| Isopropanol | iPrOH | Merck |
| Kaliumdihydrogenphosphat | KH ₂ PO ₄ | Carl Roth |
| Laemml-Probepuffer (2x) | | Bio-Rad |
| Kaliumhydroxid | KOH | Grüssing GmbH |
| Methanol | MeOH | VWR |
| 2-Mercaptoethanol | | Carl Roth |
| Molekularsieb, 4 Å | | Alfa Aesar |
| Natriumhydroxid | NaOH | Grüssing GmbH |
| Natriumdodecylsulfat | SDS | Carl Roth |
| PageRulerPrestained Protein Ladder | | Thermo Fisher Scientific |
| PageRuler Unstained Protein Ladder | | Thermo Fisher Scientific |
| Rotiphorese 10x SDS-PAGE | | Carl Roth |
| N,N,N',N'- Teramethylethylendiamin (Electran) | TEMED | VWR |
| Tetrahydrofuran | THF | Grüssing GmbH |
| Triethylamin | | Carl Roth |
| Triethylammoniumacetat Puffer, 1M | TEA | Sigma-Aldrich |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan | TRIS | Sigma-Aldrich |
| Tris(2-carboxyethyl)phosphine-Hydrochlorid | TCEP | Carl Roth |
| Trifluoressigsäure | TFA | Merck |
| Wasser (<i>LC-MS Grade</i>) | | VWR |
| Wasseraufbereitungssystem GenPure xCAD UV | | TKA |

4.1.1 Verwendete Vernetzungsreagenzien

| IUPAC-Name | Abkürzung | Bezugsquelle |
|--|-----------------|--|
| (1-[2-(2,5-dioxopyrrolidine-1-yloxy-carbonyl)-benzyloxy]-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-4-carbonsäure 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl ester) | TEMPO-Bz-Linker | Dr. Francesco Falvo, Universität zu Köln |
| Bis(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) 4,4'-carbonylbis(azanediy)l-bis-3-bromobenzoat | BrPU-Linker | Dr. Francesco Falvo, Universität zu Köln |
| N,N'-1,1'-Carbonyldiimidazol | CDI | Carbolution Chemicals GmbH |
| N,N'-1,1'-Carbonyldipyrazol | CDP | In dieser Arbeit synthetisiert |
| N,N'-1,1'-Carbonyl-di-(1,2,4-triazol) | CDT | Carbolution Chemicals GmbH |
| N,N'-Disuccinimidylcarbonat | DSC | Carbolution Chemicals GmbH |
| Imidodicarbonsäurediimidazol, N,N-Bis(1H-imidazol-1-carbonyl)imid | IDDI | In dieser Arbeit synthetisiert |

Tabelle 3 UIPAC Bezeichnungen der verwendeten Quervernetzungsreagenzien

4.1.1.1 TEMPO-Bz-und BrPU-Linker

Beide Reagenzien wurden von Dr. Francesco Falvo (AK Schäfer, Universität zu Köln) synthetisiert und bereitgestellt. Die Synthesen sind ausführlich in der Promotionsschrift von Dr. Falvo dargestellt [231].

4.1.1.2 CDI, CDT, DSC

N,N'-1,1'-Carbonyldiimidazol (98%), N,N'-1,1'-Carbonyl-di-(1,2,4-triazol) (95%) und N,N'-Disuccinimidylcarbonat (98%) wurden von Carbolution Chemicals GmbH bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

4.1.1.3 N,N'-1,1'- Carbonyldipyrazol (CDP):

Die Synthese von CDP wurde wie folgt durchgeführt:

1,4 Dioxan und Tetrahydrofuran (THF) wurden über Natrium getrocknet und in eine Molsieb (4Å) enthaltende Vorlage destilliert. 3,1 g Bis(trichlormethyl)carbonat (10,4 mmol, Sigma-Aldrich, Steinheim) wurden in 25 ml wasserfreiem Dioxan gelöst und im Eisbad gekühlt. 8,89 g Pyrazol wurden in 25 ml wasserfreiem Dioxan gelöst und unter Rühren zu dieser Mischung getropft (132,6 mmol, Merck-Schuchardt, Hohenbrunn). Nach erfolgter Zugabe wurden weitere 20 ml Dioxan zugegeben und die Mischung wurde unter Rühren über Nacht auf Raumtemperatur gebracht. Um überschüssiges Pyrazol zu fällen, wurden 2 ml 4 M HCl in Dioxan mit 10 ml wasserfreiem THF verdünnt und tropfend unter Rühren zugegeben (Alfa Aesar, Kandel). Nach 2h bei 4°C wurde die Reaktionsmischung über eine mit 1 cm Celite 532 bedeckte G4-Stielfritte filtriert (11-16 µm Porenweite, entspricht ISO P16) und der Filterkuchen wurde zweimal mit 50 ml Dioxan gewaschen. Das Filtrat wurde bis zur Trockene eingengt und über Nacht unter Vakuum eventuelle Lösungsmittelreste entfernt. Es wurden

4,49 g eines farblosen, leicht gelblichen, kristallinen Feststoffs erhalten, der ohne weitere Reinigung verwendet wurde (Ausbeute: 89% d. Th.).

Die Identität wurde mittels nESI-MS überprüft. Nach Lösen der Substanz in Acetonitril wurde $[M+H]^+$: m/z 163,064 ($R = 101.612$) erhalten. $[M+H]^+$ theoretisch: m/z 163,061.

4.1.1.4 Imidodicarbonsäurediimidazol (IDDI)

Die Synthese von IDDI wurde wie folgt durchgeführt:

In einem ersten Schritt wurde nach der Vorschrift in [232] aus Imidazoliumhydrochlorid und Kaliumcyanat das stabile Carbamoylimidazol synthetisiert. Dazu wurden 17,1 g Imidazol in 80 ml Wasser gelöst und mit 17 ml konzentrierter Salzsäure versetzt (pH-Wert der Lösung 7). Dazu wurde eine Lösung von 20,4 g Kaliumcyanat in 25,1 g Wasser unter Rühren zugegeben. Der sich bildende weiße Niederschlag wurde mehrmals mit Wasser gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Es konnten 11,34 g eines weißen Rohprodukts gewonnen werden. Dieses wurde mit 100 ml absoluten Ethanol aufgeschlämmt und nach Zugabe von 300 ml Diethylether über Nacht im Kühlschrank gelagert. Der weiße Feststoff wurde abgenutscht und mit 100 ml Diethylether gewaschen. Nach Trocknen im Hochvakuum wurden 5,898 g eines weißen, leicht elektrostatischen, feinen Pulvers gewonnen (Ausbeute 21% d. Th.). Dieses wurde ohne weitere Reinigung verwendet. Im zweiten Schritt wurde das Carbamoylimidazol mittels Carbonyldiimidazol (CDI) zur Zielverbindung umgesetzt. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von Carbamoylimidazol in nahezu allen organischen Lösungsmitteln wurde die Reaktion in Pyridin oder in Dimethylethylenharnstoff (DMEU) durchgeführt. Beispielhaft wird hier die Synthese in Pyridin dargestellt: 0,56 g Carbamoylimidazol (5 mmol) wurden unter Argonathmosphäre in 5 ml trockenem Pyridin (getrocknet über Molsieb 4Å) aufgeschlämmt. 0,91 g CDI (1,12 eq) wurden in 3 ml Pyridin gelöst und unter Rühren zugegeben und es wurde mit 2 ml Pyridin nachgespült. Die Mischung beginnt nach 10 min Rühren bei Raumtemperatur aufzuklären und es beginnt sich ein Niederschlag zu bilden. Nach Zugabe weiterer 5 ml Pyridin wurde für weitere zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert. Der feste Rückstand wurde dreimal mit je 5 ml Pyridin aufgeschlämmt und abzentrifugiert (gewaschen) wobei die Menge an Niederschlag sich merklich reduzierte. Danach wurde der Feststoff weitere dreimal mit je 5 ml trockenem Diethylether gewaschen. Der erhaltene Feststoff wurde über Nacht unter Hochvakuum getrocknet. Es wurden 967,7 mg eines weißen Feststoffs erhalten (Ausbeute des Rohprodukts: 93% d. Th.). Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung für die Quervernetzung benutzt. Die Identität wurde mittels (-)-ESI-MS überprüft ($[M-H]^-$: m/z 204,056 th.: 204,052; MS/MS(204,056): m/z 67,030 th. 67,030 für [Imidazol-H] $^-$).

4.1.2 Puffer, Lösungen und Laufmittel

Alle Puffer wurden mit entionisiertem Wasser (*MilliQ*) hergestellt und steril filtriert (0,2 µm).

Puffer und Lösungen für die Quervernetzungsreaktionen:

| | |
|---|--|
| Ameisensäure-Lösung | 1% (v/v) in MilliQ-Wasser |
| Ammoniumbicarbonat-Puffer | 1 M |
| Phosphatpuffer | 50 mM, pH 7,5, aus KH ₂ PO ₄ eingestellt mit KOH |
| TRIS-Puffer | 50 mM, pH 7,5, eingestellt mit HCl 1,5 M, pH 8,8, eingestellt mit HCl |
| HEPES-Puffer | 20 mM, pH 7,5, eingestellt mit NaOH 20 mM, pH 8,0, eingestellt mit NaOH 20 mM, pH 8,5, eingestellt mit NaOH 50 mM, pH 7,5, eingestellt mit NaOH |
| P53-Puffer | 20 mM, HEPES pH 7,2, eingestellt mit NaOH 50 mM, HEPES pH 7,2, eingestellt mit NaOH, 300 mM NaCl, 2,5 mM TCEP, 10% (v/v) Glycerin |
| Triethylammoniumacetat-Puffer (TEA Ac) | 1M in Wasser, Sigma Aldrich 100 mM und 80 mM aus Verdünnung des 1M Puffers |
| Triethylamin-Puffer (TEA) | 100 mM Triethylamin in Wasser |

Puffer und Lösungen für SDS-PAGE:

| | |
|--------------------------------|---|
| TRIS-Puffer | 0,5 M, pH 6,8, eingestellt mit HCl 1,5 M, pH 8,8, eingestellt mit HCl |
| 10% APS-Lösung (w/v) | 100 mg APS in 1 ml MilliQ-Wasser |
| 10% SDS-Lösung (w/v) | 1 g SDS in 10 ml MilliQ-Wasser |
| Laemmli-Puffer (denaturierend) | 1 ml aus 950 µl Laemmli-Probenpuffer (2x) und 50 µl 2-Mercaptoethanol hergestellt |
| SDS-Laufpuffer | 1:10 Verdünnung von Rotiphorese 10x SDS-PAGE mit Wasser |
| PAGE-Färbelösung | 1% (m/v) Coomassie Brilliant-Blau R250 in 40 % (v/v) Methanol / 10 % (v/v) Essigsäure / Wasser |
| PAGE-Entfärbelösung | 25 % (v/v) Methanol / 10 % (v/v) Essigsäure / Wasser |
| Marker für die SDS-PAGE | PAGE-Ruler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific |

Verwendete Laufmittel für die HPLC:

| | |
|------------------|---|
| Injektionslösung | 0,1 % (v/v) TFA, Wasser (<i>LC-MS Grade</i>) |
| Fließmittel A | 0,1 % (v/v) FA, Wasser (<i>LC-MS Grade</i>) |
| Fließmittel B | 0,08 % (v/v) FA, Acetonitril (<i>HPLC gradient grade</i>) |

4.1.3 Peptide

| | <u>Aminosäuresequenz:</u> | <u>Katalognummer:</u> |
|----------------|---------------------------|-----------------------|
| MRFA | MRFA | Sigma-Aldrich, M1170 |
| Thymopentin | RKD VY | Sigma-Aldrich, T8806 |
| Angiotensin II | DRVYIHPF | Alfa Aesar, J60866 |
| ACTH (18-39) | RPVKVYPNGAEDESAFAFPLEF | Sigma-Aldrich, A8346 |

| | | |
|--------------|-----------------------------|---------------------------|
| Substanz P | RPKPQQFFGLM-NH ₂ | Sigma-Aldrich, S6883 |
| DAA | DAA | AG Schutkowski, MLU Halle |
| EAA | EAA | AG Schutkowski, MLU Halle |
| VVA | VVA | AG Schutkowski, MLU Halle |
| Testpeptid 1 | Ac-TRTESTDIKRASSREADYLINKER | Creative Molecules, 008TP |

4.1.4 Proteine

| | |
|--|--|
| Rinder-Serumalbumin (BSA) | Sigma-Aldrich, Art No. 17638 |
| Guanylatcyclase aktivierendes Protein 2 (GCAP-2) | rekombinant exprimiert und gereinigt von Dr. Anne Rehkamp, AG Sinz |
| P53 | rekombinant exprimiert und gereinigt von Dr. Christian Arlt, AG Sinz |

4.1.5 Proteolytische Enzyme

Es wurden zwei Proteasen (Trypsin und Glu C) zur proteolytischen Spaltung verwendet. Die Proteasen wurden lyophilisiert bezogen. Aus dem Lyophilisat wurden jeweils Aliquote einer Stammlösung mit einem Proteingehalt von 1 µg in 2 µl einer 10 mM HCl-Lösung hergestellt. Diese wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt. Zur Herstellung der 10 mM HCl-Lösung wurde 0,1 M Endotoxin-freie Salzsäure auf 10 Teile mit steril filtriertem *MilliQ*-Wasser aufgefüllt. Es wurden folgende Proteasen verwendet:

| | |
|--------------------------------------|----------------|
| Trypsin Gold, <i>Mass Spec Grade</i> | Promega, V5280 |
| GluC, <i>Sequencing Grade</i> | Promega, V1651 |

4.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Massenspektrometer

| | |
|---|--------------------------|
| Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer mit Nanospray Flex Nano-ESI-Quelle | Thermo Fisher Scientific |
| LTQ-Orbitrap XL-Massenspektrometer mit Nanospray Flex Nano-ESI-Quelle | Thermo Fisher Scientific |
| Orbitrap Q-Exactive Plus-Massenspektrometer mit Nanospray Flex Nano-ESI-Quelle | Thermo Fisher Scientific |

Nano-HPLC

| | | |
|------------------|--|--------------------------|
| Nano-HPLC-System | UltiMate 3000 RSLC | Dionex |
| Vorsäule | Acclaim PepMap C8, 300 µm x 5 mm, 5 µm, 100 Å | Thermo Fisher Scientific |
| Trennsäule | Acclaim PepMap C18, 75 µm x 250 mm, 2 µm, 100 Å | Thermo Fisher Scientific |

Laborgeräte

| | |
|---|--------------------------|
| Analysenwaage LE225D | Sartorius |
| Analysenwaage Explorer EX 225 D/AD | Ohaus |
| Coater Scancoat Six | HHX |
| Elektrophorese-System Mini-Protean Tetra Cell (für die Sterilfiltration) Bottle Top Filterhalter | Bio-Rad Carl Roth |
| Geldokumentationssystem Gel Doc XR | Bio-Rad |
| Heizblock (Denaturierung) HTMR-133 | HLC |
| Brutschrank Heraeus Kelvitron T | Thermo Electron Corp |
| Kreislaufkühler Unitherm 4/14D | Uniequip |
| Lyophille Typ 101042 | Christ |
| Magnetrührer M21/1 | Framo |
| Magnetrührer R3T | mLw |
| Micropipette Puller P-1000 | Sutter Instruments |
| pH-Meter Seven Compact | Mettler Toledo |
| pH-Elektrode Inlab Routine Pro ISM | Mettler Toledo |
| Pipetten (2,5-5000 µl) | Eppendorf und VWR |
| Reinstwasseranlage TKA Pacific | Thermo Electrom LED |
| Rotationsverdampfer VV2011 | Heidolph |
| Sicherheitswerkbank Scanlaf Mars | Labgene |
| Spannungsgeber Power Pac 300 | Bio-Rad |
| Thermoschüttler TSC ThermoShaker | Biometra |
| Ultraschallbad Ultrasonic Cleaner | VWR |
| Vakuumkonzentrator Savant SPD1010 | Thermo Fisher Scientific |
| Vakuumpumpe MZ 2C | Vacuubrand |
| Vakuumpumpe Hybrid RC5 | Vacuubrand |
| Vacuum Controller B-720 | Büchi |
| Vortexmixer 7-2020 | neoLab |
| Wiegetisch See-Saw Rocker SSL4 | Stuart |
| Zentrifuge 5414R | Eppendorf |
| Zentrifuge 5804R | Eppendorf |
| Zentrifuge Minizentrifuge | Kisker Biotech |

Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|-----------------------------|
| Einmalspritzen (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml) | Braun |
| Falcon-Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50ml) | Fisher Scientific |
| Glaskapillaren, 1B120F-4(1,2 mm /0,68 mm AD/ID) | World Precision Instruments |
| Gradientengele 4-20 %: Mini-Protean TGX, 10well, 50µl | Bio-Rad |
| Protein Low-Bind Tubes (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml) | Eppendorf |
| Cellulose Acetat Filter, 11107-50-N 0,2 µm | Sartorius |
| Spritzenvorsatzfilter (Filtropur S 0.2) | Sarstedt |
| ZipTip-Pipettenspitzen mit 0,6 µl, C18-Material | Merck Millipore |

4.3 Software

| | |
|---|---|
| Adobe Illustrator CS4 (14.0.0) | Graphische Bearbeitung von Spektren und Abbildungen (Adobe Systems) |
| ArgusLab (4.0.1) | Zeichnen von molekularen 3D-Strukturen (Mark Thompson, http://www.arguslab.com/arguslab.com/ArgusLab.html) |
| Chromeleon (6.8) | Steuerung des HPLC-Systems und Plattform für die Aufnahme von LC-MS/MS-Daten mittels der Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) |
| ChemDraw Prime (15.1.0.144) | Zeichnen von chemischen Formeln und Reaktionsgleichungen, Simulation von Isotopenverteilungen (PerkinElmer) |
| MeroX (1.4.1-1.6.0) | Auswertung von massenspektrometrischen Daten, Suche nach Quervernetzungsprodukten MS-spaltbarer Cross-Linker (Dr. Michael Götze, MLU Halle-Wittenberg, www.stavrox.com) |
| Origin Pro 2016 64Bit | Datenanalyse und Zeichnen von Diagrammen (OriginLab) |
| ProteomeDiscoverer | Analyse von LC-MS und LC-MS/MS Originaldaten, Prozessierung und Datenexport in verschiedene Formate (Thermo Fisher Scientific) |
| Compute pI/Mw Tool | Berechnung von isoelektrischen Punkten [233] (Expasy, https://web.expasy.org/compute_pi/) |
| Peptide property calculator | Berechnung von isoelektrischen Punkten [234] (Innovagen, https://pepcalc.com/) |
| PyMol (2.3) | Visualisierung von Proteinstrukturen, Messung von räumlichen Abständen innerhalb von 3D-Strukturen (Schrödinger, https://pymol.org/2/) |
| Qual Browser (2.2) | Extraktion von Massenspektren, Tandem-Massenspektren und Rekonstruktion von Elutionsprofilen aus LC-MS/MS-Daten (Thermo Fisher Scientific) |
| Thermo Q Exactive Plus Tune (2.9.SP2) | Steuerung der Orbitrap Q Exactive Plus-Massenspektrometers, Aufnahme und Prozessierung (Thermo Fisher Scientific) |
| Venny (2.1) | Zeichnen von Venn-Diagrammen (Juan Carlos Oliveros, http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/) |
| Xcalibur (2.2) (4.0.27.19 für Q-Exactive) | Steuerung der Orbitrap Massenspektrometer, Aufnahme und Prozessierung der Rohdaten (Thermo Fisher Scientific) |

4.4 Präparative Methoden

4.4.1 Pufferauswahl und Pufferaustausch bei Peptidproben für ESI-MS

Nicht alle Puffersysteme sind zur Durchführung von Quervernetzungsreaktionen geeignet. Die für die Quervernetzung von Aminen benutzten Aktivester (bzw. die hier verwendeten Azolide) können mit nukleophilen Bestandteilen der Puffer reagieren. Puffersysteme, die Nukleophile wie z.B. Thiole, Alkohole oder primäre Amine enthalten, konkurrieren daher mit den zu vernetzenden reaktiven Gruppen der Aminosäuren. Die Auswahl nicht-nukleophiler Puffersysteme ist daher geboten, z.B. Phosphat-Puffer. Während bei Proteinproben die Verwendung gewisse Pufferkomponenten, z.B. Glycerol, essenziell sein können, ist dies für Peptidproben oft nicht der Fall. Allgemein müssen „MS-inkompatible“ Puffersubstanzen, z.B.

Tenside, Salze, aus dem Puffer der Quervernetzungsreaktion entfernt werden, um die Reaktionsprodukte mittels ESI-MS zu untersuchen.

Während für Proteinlösungen mittels Dialysemembranen oder speziellen Materialien der Größenausschlusschromatographie sogar native, technische Lösungen zum Pufferaustausch bestehen, existieren für einen Pufferaustausch von Peptidlösungen nur sehr wenige technische Lösungen, wenn man von der Flüssigkeitschromatographie absieht. Die Methode der Wahl zur Entfernung von Salzen und anderen kleinen Molekülen ist die Absorption an geeigneten Trägermaterialien mit späterer Elution (sog. *Solid Phase Extraction*). Zu diesem Zweck wurden Pipettenspitzen entwickelt, die mit einem festen Bett aus durchlässigem Trägermaterial bestückt sind (*Zip-Tip*, Millipore) oder mit selbst ausgestanztem Material versehen werden (*StageTips*, [235]). Die hier verwendeten C_{18} *Zip-Tips* (Millipore) sind 20 μ l fassende Pipettenspitzen, an deren innerer Öffnung ein festes Bett aus Trägermaterial sitzt, welches mit langen hydrophoben Alkylketten (C_{18}) modifiziert wurde. Vor der Verwendung wird das Trägerbett durch mehrmaliges Spülen mit Acetonitril oder Methanol aktiviert und anschließend durch mehrmaliges Spülen mit einem geeigneten Puffer vor der Absorption der Analyten equilibriert. Mehrmaliges Aufziehen der Probenlösung über das Trägermaterial führt zur Sättigung mit dem Analyten. Anschließend können durch mehrmaliges Waschen des Trägerbetts mit einem MS-kompatiblen Puffer an den Analyten gebundene Puffersubstanzen ausgetauscht werden. Im Anschluss wird der Analyt durch einen Eluenten mit hohem Anteil eines organischen Lösemittels vom Trägerbett gelöst und aufgenommen. Die erhaltene Analytlösung kann direkt mittels ESI-MS/MS untersucht werden.

4.4.2 Untersuchungen mittels SDS-Gelelektrophorese

Zur Reaktionskontrolle der Quervernetzung der Proteine wurden denaturierende Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophoresen (SDS-PAGE) durchgeführt. Zuerst wurden die Proteine mittels Laemmli-Puffer [236] und Mercaptoethanol reduziert und denaturiert.

Die Proteinlösungen (10 μ M) werden mittels Zusatz von 1 Äquivalent (vol.) denaturierendem Laemmli-Puffer und 5-minütigem Inkubieren bei 90°C denaturiert. Daraufhin wurden je 15 μ l der Lösung pro Geltasche aufgetragen. Es wurden entweder kommerzielle Gradientengele (4-20%, Mini-PROTEAN TGX, BioRad) für eine kontinuierliche SDS-PAGE oder selbst gegossene diskontinuierliche 10%-ige Acrylamidgele verwendet (Tabelle 4). Für eine Trennung wurde für ca. 15 min eine Spannung von 100 V angelegt, bis die Probe vollständig in das Gel eingewandert war. Dann wurde für 50 -70 min bei einer Spannung von 180 V die Trennung durchgeführt. Anschließend wurden die Gele nach zweimaligem Waschen mit

Wasser in die Coomassie-basierte PAGE-Färbelösung (vgl. Kapitel 4.1.2) gegeben und über Nacht geschwenkt, um die Proteine zu fixieren und zu färben. Danach wurden die Gele für mehrere Stunden in Entfärbelösung geschwenkt, bis der Gelhintergrund vollständig entfärbt war. Im Anschluss wurden die Gele mit Wasser gewaschen und mittels des Geldokumentationssystems fotografiert.

| | Trenngel (10 %) | Sammelgel (5 %) |
|--|------------------------|------------------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 40 % (19:1) | 2500 µl | 650 µl |
| 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 | 2500 µl | - |
| 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 | - | 1250 µl |
| MilliQ-H₂O | 5340 µl | 3000 µl |
| 10 % (w/v) SDS- Lösung | 100 µl | 50 µl |
| TEMED | 10 µl | 10 µl |
| 10 % (w/v) APS-Lösung | 50 µl | 25 µl |

Tabelle 4 Zusammensetzung der 10%-igen SDS-Polyacrylamidgele

4.4.3 Enzymatische Proteolyse

Alle Proben waren durch die gewählten Reaktionsbedingungen und/ oder das *Quenching* mittels Ammoniumbicarbonat-Lösung oder TRIS-Lösung (pH 8,8) ausreichend basisch ($\text{pH} \geq 8$), um der Proteolyse mit den hier verwendeten Proteasen zugeführt zu werden. Daher wurden die pH-Werte nicht erneut angepasst.

Für die Proteolyse der Reaktionsmischung des Testpeptids 1 wurde eine vereinfachte Behandlung mittels Trypsin durchgeführt, indem zum Reaktionsansatz 1 µg (entsprechend einem 2µl-Aliquot, vgl. Kapitel 4.1.5) Trypsin zugegeben wurde und über Nacht bei 37°C inkubiert wurde.

Zur Proteolyse der Proteinlösungen (in dieser Arbeit immer ~10 µM) wurden diese zuerst mittels Natrium-Deoxycholat (DOC) denaturiert. Im Anschluss daran wurden mittels DDT Disulfidbrücken reduziert und durch Iodacetamid alkyliert. Dazu wurden zu je 50 µl Probenlösung 4 µl einer 10 %-igen (w/v) Natrium-DOC-Lösung gegeben und für 15 min im Ultraschallbad behandelt. Im Anschluss wurden 5 µl einer 40 mM DTT-Lösung zugegeben und bei 56°C für 30 min inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 5 µl einer 100 mM Iodacetamid-Lösung zugegeben und für 20 min in Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Um die unerwünschte übermäßige Carbamidierung anderer nukleophiler Gruppen zu vermeiden (nicht-Thiole), wurden im Anschluss 10 µl der 40 mM DDT-Lösung zugegeben. Nach Zugabe von 6 µl Wasser wurden so 80 µl der reduzierten und alkylierten Proteinprobe erhalten.

Für eine anschließende tryptische Proteolyse wurden je ein 2 µl-Aliquot Trypsin (1 µg) mit 8 µl Wasser aufgefüllt und die 10 µl Lösung zu den 80 µl Probe zugegeben (Enzym-Substrat-Verhältnis von 50:1 (w/w) bei einer 10 µM-Lösung eines 100 kDa-Proteins). Nach

Durchmischen der Proben wurde bei 37°C ca. 16 h inkubiert. Um die Proteolyse zu stoppen, wurden 10 µl einer 10 %-igen (v/v) TFA-Lösung zugegeben (pH < 2). Die ausfallende Deoxycholsäure wurde mittels Zentrifugation für 5 min bei 14.000 g von der Lösung getrennt und der klare Überstand in ein neues 0,5 ml Eppendorf Gefäß (Protein-Low-Bind) überführt.

Bei der doppelten proteolytischen Spaltung mittels GluC und Trypsin wurde abweichend davon zuerst mit GluC (Enzym-Substrat-Verhältnis 25:1, (w/w)) für 16 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde Trypsin (Enzym-Substrat-Verhältnis 1:12, (w/w)) zugegeben und erneut für 4 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Proteolyse mittels Zusatz von 10 %iger (v/v) TFA-Lösung gestoppt.

Die verwendeten Lösungen wurden stets frisch hergestellt:

| | |
|---|---|
| Denaturierungslösung | 10 % Natrium-Deoxycholat in <i>MilliQ</i> -Wasser (w/v) |
| Reduktionslösung / Abstoppen der Alkylierung | 40 mM DTT in <i>MilliQ</i> -Wasser (61,7 mg / 10 ml) |
| Alkylierungslösung | 100 mM Iodacetamid in <i>MilliQ</i> -Wasser (92,5 g / 5 ml) |
| Abstoppen der Proteolyse | 10 % TFA in <i>MilliQ</i> -Wasser (v/v) |

4.5 Durchführung der Vernetzungsreaktionen

4.5.1 Vernetzungsstudien des TEMPO-Bz-Linkers mit Peptiden

Es wurde eine Stammlösung des Tempo-Bz-Linkers in wasserfreiem DMSO hergestellt. Die lyophilisierten Peptide (MRFA, Angiotensin II, Thymopentin und Testpeptid 1, vgl. Kapitel 4.1.3) wurden jeweils in 20 mM HEPES-Puffer, pH 8,5 gelöst und eine Peptidkonzentration von 50 µM eingestellt. Dann wurde bei Raumtemperatur 1/20 (v/v) Cross-Linker-Stammlösung zu den Peptidlösungen gegeben. Nach zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 1/20 (v/v) 1M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (Endkonzentration von 50mM) gestoppt.

Im Fall des Testpeptids 1 wurde im Anschluss eine enzymatische Proteolyse mittels Trypsin durchgeführt (vgl. Kapitel 4.4.3). Danach wurden die Proben mittels *C*₁₈-*ZipTip*-Säulen entsalzt, indem diese zuvor dreimal mit Acetonitril und zehnmal mit 1% (v/v) Ameisensäure äquilibriert wurden. Nach Aufziehen der Peptidmischung wurde zehnmal mit 1% (v/v) Ameisensäure gewaschen. Die Peptide wurden dreimal mit je 5 µl einer Lösung von 70 % (v/v) Acetonitril und 1% (v/v) Ameisensäure eluiert. Zu den vereinten 15 µl-Peptidproben wurde vor der Aufnahme der (-)-ESI-Massenspektren 0,5 µl Ammoniaklösung (30%, v/v) gegeben um einen pH-Wert von ~10 einzustellen. Diese Lösung wurde direkt mittels statischer nano-ESI-MS untersucht.

4.5.2 Vernetzungsstudien an Peptiden mit Tempo-Bz- und Br-PU -Linker

Es wurden jeweils 20 mM Stammlösungen der lyophilisierten Tripeptide DAA, EAA und VVA in trockenem DMSO und aus den lyophilisierten Peptiden Angiotensin II und Testpeptid 1 jeweils 10 mM Stammlösungen in Wasser hergestellt. Die Stammlösungen wurden zu 2 μ L aliquotiert. Für die Quervernetzung der Tripeptide wurden je ein 2 μ L-Aliquot des Peptids mit 3 μ L wasserfreiem Triethylamin gegeben, um 5 μ L einer 8 mM Peptidlösung zu erhalten. Zu diesen Ansätzen wurden daraufhin je 5 μ L einer 8 mM Stammlösung des betreffenden Cross-Linkers in DMSO gegeben (molares Verhältnis 1:1). Nach 30 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde 1 μ L Wasser zu den Proben gegeben, um freien, überschüssigen Cross-Linker zu hydrolysieren. Dazu wurden die Proben über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Die Proben wurden anschließend mit 180 mM Triethylamin-Acetat-Puffer auf 133 μ L aufgefüllt, um eine 300 μ M Peptidlösung mit 5 % DMSO (v/v) zu erhalten. Für die Quervernetzung von Angiotensin II und Testpeptid 1 wurden zu einem 2 μ L-Aliquot jeweils 3,5 μ L DMSO, 0,5 μ L Triethylamin und 0,5 μ L 1M Triethylamin-Acetat-Puffer gegeben. Zu dieser Peptidlösung wurden 3,5 μ L einer 40 mM Cross-Linker-Stammlösung in DMSO gegeben (7 Äquivalente bezogen auf Peptid). Die so erhaltenen 10 μ L einer 2 mM Peptidlösung in 70 % DMSO wurden über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Dann wurden 40 μ L einer wässrigen Lösung von 80 mM Triethylamin und 20 mM Triethylamin-Acetat-Puffer zugegeben, um 50 μ L einer 400 μ M Peptidlösung mit einem DMSO-Gehalt von 14 % (v/v) zu erhalten. Testpeptid 1 wurde daraufhin einer enzymatischen Proteolyse mit Trypsin unterzogen (siehe 4.4.3).

Die Proben wurden anschließend mittels C_{18} -ZipTip-Säulen entsalzt. Die C_{18} -ZipTip-Säulen wurden zuvor dreimal mit Acetonitril und zehnmal mit 0,1 M Triethylamin-Acetat-Puffer äquilibriert. Es wurde fünfmal (Tripeptide) bzw. siebenmal (Angiotensin II und Testpeptid 1) mit 0,1 M Triethylamin-Acetat-Puffer gewaschen und die immobilisierten Peptidproben wurden bis zur Messung bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Direkt vor der Messung wurden die immobilisierten Proben der Tripeptide erneut mit 10 % (v/v) (für DAA und EAA) bzw. 30 % (v/v) Acetonitril (für VVA) in Wasser gewaschen. Die Proben von Angiotensin II und Testpeptid 1 wurden mit 40 % (v/v) Acetonitril in Wasser gewaschen. Die so vorbereiteten Proben wurden im Anschluss je dreimal mit 5 μ L einer wässrigen Lösung von 80 % (v/v) Methanol und 0,8 % (v/v) Triethylamin eluiert. Die drei Elutionen wurden zu 15 μ L Probe vereint. Diese Lösung wurde direkt mittels statischer nano-ESI-MS analysiert. Eine Übersicht der erstellten Ansätze ist in **Tabelle 5** gezeigt.

| | Tripeptide DAA,EAA,VVA | Angiotensin II und Testpeptid 1 |
|---|---|---|
| Peptidstammlösung | 20 mM in DMSO | 10 mM in Wasser |
| Volumen | 2 µL- Aliquot | 2 µL- Aliquot |
| verdünnt mit | 3 µL TEA | 3,5 µl DMSO, 0,5µL TEA 0,5 µl 1M TEA-Acetat |
| Cross-Linker- Stammlösung | 8 mM in DMSO | 40 mM in DMSO |
| Volumen | 5 µL | 3,5 µL |
| Molares Verhältnis Cross-Linker : Peptid | 1 : 1 | 7 : 1 |
| Zusammensetzung der Reaktionsmischung | Volumen: 10 µL Peptidkonz.: 4 mM DMSO-Gehalt: 70 % wasserfrei | Volumen: 10 µL Peptidkonz.: 2 mM DMSO-Gehalt: 70 % wässriger TEA-Acetat-Puffer |
| Reaktionszeit | 30 min RT | Über Nacht bei RT |
| Quenchen durch Zugabe von | 1 µL Wasser, dann 123 µL 180 mM TEA-Acetat | 40 µL wässrige Lösung 80 mM TEA und 20 mM TEA-Acetat |
| Entstandene Reaktionsmischung | 133 µL, 300 µM Peptid 5 % DMSO- Gehalt | 50 µL, 400 µM Peptid 14 % DMSO- Gehalt |
| Anschließende Proteolyse | nein | Nur Testpeptid 1 mit Trypsin |
| ZipTips äquilibriert mit | 0,1 M TEA-Acetat (10x) | 0,1 M TEA-Acetat (10x) |
| Waschen vor Elution | 5 x 0,1 M TEA-Acetat 1 x 10 % AcN (DAA und EAA) bzw. 1 x 30 % AcN (VVA) | 7 x 0,1 M TEA-Acetat 1 x 40 % AcN |
| Elution mit | 3 x 5 µL 80 % MeOH, 0,8 % TEA (vereint) | 3 x 5 µL 80% MeOH, 0,8% TEA vereint zu 15µL Probe |

Tabelle 5 Reaktionsansätze der Peptidstudien von TEMPO-Bz-Linker und Br-PU

4.5.3 CDI, CDP, CDT, DSC

4.5.3.1 Reaktivitätsuntersuchungen an Serumalbumin

Anhand von lyophilisierten Rinder-Serumalbumin (BSA, Sigma Aldrich) wurde die Eignung der vier Vernetzungsreagenzien zur Quervernetzung untersucht. Dazu wurde eine 10 µM BSA-Stammlösung in 50 mM HEPES-Puffer (pH 8,0) hergestellt. Es wurden Reaktionstemperatur, molarer Überschuss des Quervernetzungsreagenzes und die Reaktionszeit als Einflussfaktoren berücksichtigt. Zunächst wurde ein 100-fach und später zusätzlich ein 500-fach molarer

Überschuss an Vernetzungsreagenz erprobt. Dazu wurden 50 mM und 100 mM Stammlösungen der vier Reagenzien in wasserfreiem DMSO, das vorher über Molsieb 3 Å gelagert wurde, hergestellt.

Für die Versuche mit 100-fachem molarem Überschuss an Vernetzungsreagenz wurden jeweils 49 µl Proteinlösung mit 1 µl der 50 mM Reagenzlösung versetzt. Die Reaktionsmischungen wurden entweder auf Eis für 2 h oder bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Später wurden zusätzlich alle Reaktionsmischungen bei 10°C für 1 h inkubiert.

Die Versuche mit 500-fachem molarem Überschuss wurden auf Eis für 2 h durchgeführt und dienten als Kontrolle, ob eine Reaktivität trotz geringer Temperatur beobachtet werden kann. Dazu wurden jeweils 47,5 µl Proteinlösung mit 2,5 µl der 100 mM Reagenzlösung versetzt. Die erhaltenen Reaktionsmischungen wurden im Anschluss direkt einer denaturierenden SDS-PAGE (10%-Acrylamid-Gele) unterzogen und die erhaltenen Gele wurden qualitativ visuell bewertet.

4.5.3.2 Vernetzungsstudien von CDI an BSA, p53 und GCAP-2

Lyophilisiertes Rinder-Serumalbumin (BSA, Sigma Aldrich) wurde ohne weitere Reinigung verwendet. Gereinigtes, rekombinant in *E. coli* exprimiertes p53 wurde von Dr. Christian Arlt (AK Sinz, MLU Halle) bereitgestellt. Gereinigtes, rekombinant in *E. coli* exprimiertes Guanylatcyclase-aktivierendes Protein 2 (GCAP-2) wurde von Dr. Anne Rehkamp (AK Sinz, MLU Halle) bereitgestellt.

Aus BSA wurden jeweils 10 µM Stammlösung in 20 mM HEPES-Puffer mit verschiedenen pH-Werten hergestellt. Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Quervernetzungseffizienz zu überprüfen, wurde BSA sowohl bei pH 7,5 und 8,0 umgesetzt. Für GCAP-2 wurde ausschließlich pH 7,5, für p53 nur pH 7,2 verwendet, da die jeweiligen Proteinlösungen bei diesen pH-Werten bereitgestellt wurden. Des Weiteren wurden verschiedene Konzentrationen an CDI eingesetzt. Für BSA wurden Konzentrationen von 10, 100, 200 und 500 µM verwendet (entsprechend einem molaren Verhältnis von 1:1, 1:10, 1:20, 1:50). Für p53 wurden Konzentrationen von 200 µM und 500 µM verwendet (entsprechend einem molaren Verhältnis von 1:20 und 1:50, bezogen auf das p53-Tetramer). Für GCAP-2 wurde nur eine Konzentration von 200 µM CDI (entspricht molarem Verhältnis von 1:20) verwendet. Um den Einfluss der Temperatur auf die Reaktivität des CDI zu testen, wurde mittels BSA die Reaktivität bei 0°C, 10°C und 20°C untersucht. Für das bei Raumtemperatur instabile p53 wurden die Reaktionen nur bei 10°C und für GCAP-2 bei 20°C (Raumtemperatur) durchgeführt (vgl. Kapitel 5.4).

Es wurde eine 1 mM bzw. 10 mM Lösung von CDI in trockenem DMSO (kritischer Einflussfaktor) frisch hergestellt. Dann wurde zu der 10 µM Proteinlösung (auf betreffende

Temperatur, pH-Wert eingestellt) die benötigte Menge CDI-Stammlösung zugegeben, so dass der Gehalt an DMSO in der Reaktionsmischung 5 % (v/v) nicht überstieg. Nach 30 min wurde die Reaktionsmischung durch Zugabe von 1,5 M TRIS-Puffer (pH 8,8) auf eine Konzentration von 25 mM eingestellt, um die Reaktion zu stoppen. Die Reaktionsmischungen wurden daraufhin einer enzymatischen Proteolyse unterzogen. Dabei wurde für BSA nur Trypsin eingesetzt, für p53 und GCAP-2 wurde eine sequenzielle Proteolyse mit GluC und anschließend Trypsin durchgeführt.

4.5.4 Vernetzungsstudien an Peptiden mit IDDI-Linker

Das IDDI-Reagenz wurde in über Molsieb 3\AA getrocknetem DMSO gelöst und dann im 10-fachen molaren Überschuss zu 100 μM Stammlösungen der vier Modellpeptide MRFA, Thymopentin, Angiotensin II und Substanz P in 20 mM HEPES-Puffer (pH 8,0) gegeben. Nach 30 Minuten wurde die Quervernetzungsreaktion durch Zugabe von TRIS-Puffer (pH 8,8) gestoppt (TRIS-Konzentration 45 mM). Die Proben wurden anschließend mittels C_{18} -*ZipTip*-Säulen entsalzt. Die C_{18} -*ZipTip*-Säulen wurden zuvor dreimal mit Acetonitril und zehnmal mit 1%iger wässriger Ameisensäure äquilibriert. Es wurde zehnmal mit 1%iger Ameisensäure gewaschen. Die so vorbereiteten Proben wurden im Anschluss je dreimal mit 5 μl einer wässrigen Lösung von 70 % Acetonitril (v/v) und 1 % (v/v) Ameisensäure eluiert. Die drei Elutionen wurden zu 15 μl Probe vereint. Diese Lösung wurde direkt mittels statischer nano-ESI-MS analysiert.

4.6 Massenspektrometrische Methoden

4.6.1 Statisches Nano-Elektrospray

Alle Peptidproben wurden vor der Messung entsalzt, bzw. einem Pufferaustausch mittel C_{18} -*ZipTip*-Säulen unterzogen. Für die statische Nano-Elektrosprayionisation (offline n-ESI) wurden je nach Cross-Linker und Probe zwischen 1,1 und 1,3 kV entweder positiver Polarität, (+)-ESI, oder negativer Polarität, (-)-ESI, an den Emitter angelegt, um den Elektrosprayprozess auszulösen.

Als Kapillaren wurden 4“ lange Glaskapillaren aus Borosilikatglas mit innenliegendem Glasfilament verwendet (4“, 1,2 mm /0,68 mm AD/ID, feuerpoliert, mit Filament, World Precision Instruments Inc.). Die Kapillaren wurden mittels des *Micropipette Puller Model P-1000* (Sutter Instruments) an einem Ende zu feinen Kapillarspitzen ausgezogen und dann mit Gold bedampft.

Alle Peptidproben wurden mittels des Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometers untersucht, welche mit der n-ESI Quelle *Nanospray Flex Ion Source* (Thermo Fisher Scientific) ausgestattet war. Die Quellentemperatur betrug in allen Versuchen 275°C. Für die Versuche mit Br-PU wurde ein zusätzliches Spannungspotential von 30-60 V in der Quellenregion angelegt, um eventuell auftretende Gasphasenaddukte vor der Isolierung im Quadrupol aufzuspalten (*in-source activation*).

4.6.2 MS/MS- und MS³-Experimente

Um die entstandenen Quervernetzungsprodukte der Peptide zu untersuchen, wurden sowohl Tandem-Massenspektren (MS/MS) mittels CID und HCD, als auch MS³-Spektren mittels CID aufgenommen. Um beide kollisionsaktivierte Fragmentierungsmethoden zu nutzen, wurde das Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer genutzt. Nach Aufnahme der Massenspektren wurden die betreffenden Vorläuferionen im Quadrupol mit einem Massenfenster von 2 u selektiert und dann mittels CID bzw. HCD fragmentiert. Nach erfolgter Fragmentierung wurden jeweils Fragmentationenspektren im Orbitrap-Massenanalysator bei einer Auflösung von R=120.000 bei m/z 200 aufgenommen.

Die Fragmentierung der Vorläuferionen erfolgte für CID-Experimente innerhalb der linearen Ionenfalle (LIT, Abbildung 7) des Massenspektrometers mit Helium als Hintergrundgas. Dabei wurden verschiedene Kollisionsenergien in Form der *Normalized Collision Energy* (% NCE) eingestellt. Es wurden jeweils ca. 50 MS/MS-Spektren aufgenommen und anschließend gemittelt. Für MS³-Experimente wurden die entstandenen Fragmentationen nicht direkt im Orbitrap-Massenanalysator detektiert, sondern erneut innerhalb der LIT selektiert. Dort wurden sie mit gleicher Kollisionsenergie mittels CID fragmentiert und die entstandenen Fragmentationen (MS³) der aus dem MS/MS stammenden Vorläuferionen nach Überführung in den Orbitrap-Massenanalysator mit einer Auflösung von R=120.000 bei m/z 200 analysiert.

Für die Aufnahme der HCD-Fragmentationenspektren wurden in gleicher Weise die Vorläuferionen im Quadrupol mit einem Massenfenster von 2 u selektiert und in Anschluss in der HCD-Zelle mit Stickstoff als Hintergrundgas fragmentiert (*beam-type CID*). Es wurden jeweils 50 Scans im Orbitrap-Massenanalysator mit einer Auflösung von R=120.000 bei m/z 200 gemittelt. Obwohl die Kollisionsenergie gleichsam als % NCE eingestellt wurde, ergaben sich meist reichere Fragmentationenspektren, die vergleichend mit den CID-Spektren analysiert wurden.

4.6.3 Nano-HPLC-MS/MS

Zur Untersuchung der Quervernetzungsprodukte der Proteinproben wurde vor der massenspektrometrischen Analyse eine chromatographische Trennung der komplexen Probengemische mittels Nano-HPLC durchgeführt. Das Chromatographiesystem (Ultimate 3000 RSLC Nano-HPLC-System) war zu diesem Zweck mit dem Massenspektrometer gekoppelt und die Steuerung der chromatographischen als auch massenspektrometrischen Parameter erfolgte mittels der Chromaeleon- und Xcalibur-Software (vgl. Kapitel 4.3).

Die zu untersuchenden Proben wurden in einen programmierten Probengeber (gekühlt auf 4°C) gegeben und dann automatisch in eine Probenschleife aufgenommen. Aus der Probenschleife wurden die Proben dann zuerst auf eine 5mm lange C₈-Vorsäule überführt (vgl. Kapitel 4.2). Die an der Vorsäule adsorbierten Analytmoleküle wurden im Anschluss mittels eines 15-minütigen Waschschriffs entsalzt (0,1 % TFA (v/v), Flussrate 20 µl / min). Anschließend wurde die Probe durch den Eluenten B (0,8 % FA in AcN (v/v), Flussrate 300 nl/min) von der Vorsäule eluiert und auf eine 15 cm lange C₁₈-Trennsäule (vgl. Kapitel 4.1.2 und 4.2) überführt. Zur chromatographischen Trennung wurde innerhalb eines 90-minütigen Gradienten der Gehalt an Eluent B von 0 % (v/v) auf 35 % (v/v) erhöht und die Analytmoleküle somit eluiert. Um stark hydrophile Analyten zu eluieren, wurde der Gradient innerhalb von 5 Minuten auf 85 % (v/v) Eluent B erhöht und für weitere 5 Minuten gehalten. Der Gradient wurde dann wieder auf 0% Eluent B bzw. 100 % Eluent A (0,8 % FA, Wasser) gesenkt und die Säule für 15 Minuten vor der nächsten Probeninjektion äquilibriert. Die eluierten Analytmoleküle wurden direkt in die Nano-ESI-Quelle des Massenspektrometers (Orbitrap Fusion Tribrid oder Orbitrap Q-Exactive Plus, vgl. Kapitel 4.2) geleitet und kontinuierlich ionisiert. Die Massenspektren wurden in einem *m/z*-Bereich von 300-2000 mit einer Auflösung von R=60.000 bei *m/z* 200 aufgenommen. Nach der Aufnahme eines Massenspektrums wurden jeweils für 5 Sekunden Tandem-Massenspektren (MS/MS) aufgenommen. In diesen Experimenten wurde ein Massenfenster von 2 u gewählt und eine Fragmentierung mittels *stepped HCD* bei 30±3 % NCE durchgeführt. Bei diesem Verfahren wurde die Kollisionsenergie innerhalb eines Scan Stufenweise von 27 % über 30 % auf 33% erhöht. Nach erfolgter Fragmentierung wurden die Ionen innerhalb des Orbitrap-Massenanalysators mit einer Auflösung von R=15.000 bei *m/z* 200 analysiert. Die Vorläuferionen wurden mit absteigender Intensität innerhalb des 5-Sekunden-Fensters fragmentiert. Die Selektion der möglichen Vorläuferionen wurde begrenzt, indem nur Vorläuferionen mit Ladungszuständen von +2 - +8 selektiert und bereits zuvor fragmentierte Vorläuferionen eines gewissen *m/z*-Wertes für einen Zeitraum von 60 Sekunden kein zweites Mal selektiert wurden (*Dynamic Exclusion*).

4.6.4 Auswertung mittels MeroX Software

Die erhaltenen Daten wurden mittels Proteome Discoverer direkt in *.mgf- Dateien konvertiert und mittels MeroX Software analysiert. Die betreffenden Daten mit den enthaltenen Einstellungen sind auf der beigefügten CD (Anhang) enthalten.

5 Quervernetzung mit N,N'-Carbonyldiimidazol

5.1 Zielstellung

MS-spaltbare Quervernetzungsreagenzien mit einer Harnstoff-Funktion werden in verschiedenen *Spacer*-Längen und reaktiven Kopfgruppen verwendet [80], [197], [237], [238] (Tabelle 1). Zu ihrer Synthese werden zunächst der zentrale Harnstoff und dann die reaktiven Kopfgruppen aufgebaut. Das kürzeste Aktivester-basierende Reagenz wird durch Verknüpfung zweier Glycine zum Harnstoff und anschließender Aktivierung zum NHS-Ester gebildet. Gelingt es jedoch, eine Harnstoffverknüpfung im Wässrigen ausschließlich aus den Aminogruppen der Aminosäuren aufzubauen, wird eine direkte Quervernetzung erzielt (*zero-length*). Es werden damit die kürzest-möglichen Abstandsinformationen erhalten und hydrolysierte Quervernetzungsprodukte (Typ 0) zerfallen aufgrund ihrer Instabilität (Carbaminsäuren). Da diese teil-hydrolysierten Quervernetzungsprodukte bei Aktivester-basierten Reagenzien einen hohen Anteil der falsch zugeordneten Spektren darstellen können [114], wird die Datenauswertung nicht nur vereinfacht, sondern auch verlässlicher. Die zur Harnstoffverknüpfung zur Verfügung stehenden Reagenzien sollten auf ihre Eignung zur Quervernetzung von Proteinen im Wässrigen getestet und auf mehrere Proteine angewendet werden.

5.2 Auswahl und Reaktivität der eingesetzten Vernetzungsreagenzien

Im Gegensatz zur üblichen Aktivester-basierten Verknüpfung von Aminen, wurde besonderes Augenmerk auf die Eignung von Azolid-basierten Reagenzien gelegt, welche schon 1928 zur Azolid-vermittelten Peptidsynthese [239] genutzt wurden. Kinetische Studien der wässrigen Hydrolyse der N-Acetylazole (Tabelle 6) [240] zeigten eine, mit der Anzahl an Stickstoffatomen im Heterozyklus einhergehende, gesteigerte Reaktivität, welche zudem vom verwendeten Isomer des Azols abhängt. Die mehrere Magnituden überspannende Reaktivität der Azolide erreicht ihr Maximum in der Reaktivität der Azolide des Tetrazols, die augenblicklich hydrolysieren und daher keine Anwendung finden.

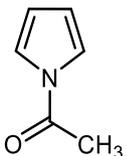
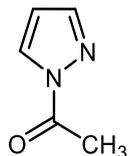
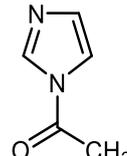
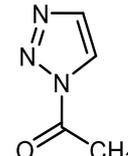
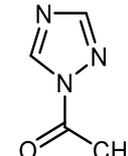
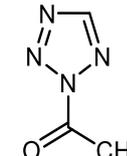
| |  |  |  |  |  |  |
|----------------------------|---|---|---|---|---|---|
| $k' \cdot 10^5 [sec^{-1}]$ | → 0 | 1,27 | 28,2 | 43,5 | 180 | > 2000 |
| $\tau_{1/2} [min]$ | → ∞ | 908 | 41 | 26,6 | 6,4 | < 0,5 |
| $\nu_{C=O} [cm^{-1}]$ | 1732 | 1746 | 1747 | 1762 | 1765 | 1779 |

Tabelle 6 Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten der Hydrolyse verschiedener N-Acetylazole (Gemessen bei pH 7,0 und 25°C, die Wellenzahl der Carbonyl-Streckschwingung ist nach [226] angegeben.)

Die zur Erzeugung der quervernetzenden, spaltbaren Harnstoffgruppe nötigen symmetrischen Diazolide der Kohlensäure können entsprechend durch die Wahl der Azole in ihrer Reaktivität angepasst werden. Breite Verwendung findet vor allem das erstmals 1956 synthetisierte N,N'-Carbonyldiimidazol (CDI) [225], welches eine dem Phosgen ähnliche Reaktivität zeigt [241], jedoch ein gut zu handhabender Feststoff ist. Ebenso Verwendung findet das reaktivere N,N'-Carbonyl-di-1,2,4-triazol (CDT), das auch kommerziell erhältlich ist.

Am Beispiel des CDI sind in Abbildung 23 die möglichen synthetischen Anwendungen verdeutlicht: Mittels CDI können Carbonsäuren unter sehr milden Bedingungen in die entsprechenden Imidazolide überführt werden – als Nebenprodukte entstehendes Imidazol und Kohlendioxid stören bei den meisten Umsetzungen (Eintopf-Verfahren) nicht (Abbildung 23 A). CDI selbst zersetzt sich bei Kontakt mit Wasser sehr schnell zu Imidazol und Kohlendioxid (Abbildung 23 B). Dies scheint einer Anwendung auf wässrige Proteinsysteme zunächst entgegenzustehen. Jedoch können nach Substitution eines der Imidazole mit einem geeigneten Nukleophil, mäßig stabile Azolide der Harnstoffe, Carbamate oder Thiocarbamate erzeugt werden (Abbildung 23 C).

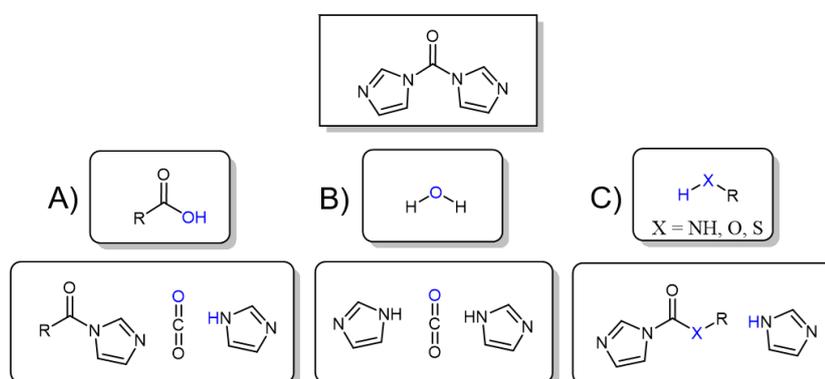


Abbildung 23 Reaktivitäten von CDI mit verschiedenen Nukleophilen

A) Bildung des N-Acylazols mit Carbonsäuren

B) Hydrolyse mit Wasser

C) Bildung von Azoliden Vorstufen der Harnstoffe, Carbamate und Thiocarbamate

Nach weiterer nukleophiler Substitution des zweiten Imidazols werden auf diese Weise z. B. Harnstoffe (Abbildung 24 C) und Carbamate (Abbildung 24 B) erhalten. Zudem können Kohlensäureester aus CDI und Alkoholen gebildet werden [241] (Abbildung 24 A). Zumindest für die aus Aminen entstehenden Harnstoffe ist die bekannte MS-Spaltbarkeit zu erwarten und für Carbamate zu vermuten.

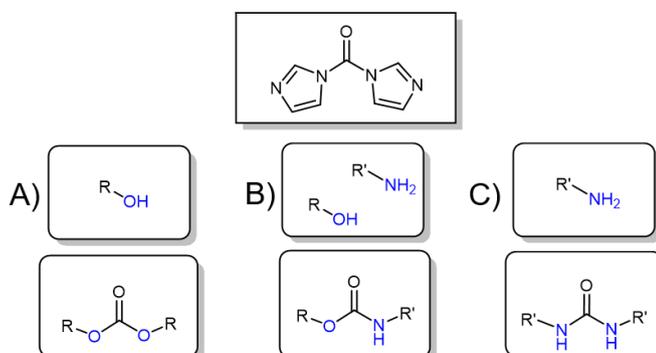


Abbildung 24 Bildung von Kohlensäurederivaten aus CDI.

- A) Carbonate aus Alkoholen
 B) Carbamate aus Alkoholen und Aminen
 C) Harnstoffe aus Aminen

Beim Einsatz von Diazoliden mit gesteigerter Reaktivität tritt zwangsläufig auch eine beschleunigte Hydrolyse, sowohl des Carbonyldiazolids als auch des intermediär gebildeten, monosubstituierten Carbonylazolids auf. Zusätzlich zum CDI wurden die zwei Carbonyldiazolide ausgewählt, die in ihrer Reaktivität unterhalb und oberhalb von CDI stehen (Tabelle 7). Carbonyldipyrazol ist nicht kommerziell erhältlich und wurde aus Triphosgen und Pyrrazol synthetisiert (siehe Kapitel 4.1.1).

| Name | Carbonyldipyrazol (CDP) | Carbonyldiimidazol (CDI) | Carbonyl-di-1,2,4-triazol (CDT) | Disuccinimidylcarbonat (DSC) |
|----------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| Struktur | | | | |
| $k' \cdot 10^3 [sec^{-1}]$ | --- | 6,43 | 12,9 | - |
| $\tau_{1/2} [min]$ | --- | 1,8 | 0,9 | - |
| $\nu_{C=O} [cm^{-1}]$ | 1743, 1719 | 1762, 1732 | 1792, 1770 | - |

Tabelle 7 Geschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse einiger N,N'-Carbonylbisazole in THF/Wasser (40:1) bei 27°C nach [226]

Zum Vergleich der Reaktivitäten der Azolide („Aktivamide“) mit der Reaktivität der üblicherweise genutzten N-Hydroxysuccinimidester („Aktivester“) wurde zudem das bekannte Disuccinimidylcarbonat (DSC) verwendet. Dieses wurde zuerst als symmetrisches Karbonat aus N-Hydroxysuccinimid und CDI synthetisiert. Da die Substanz aber nur als hygroskopischer, mit CDI verunreinigter, Feststoff erhalten werden konnte, wurde im weiteren Verlauf

ausschließlich mit reinem, käuflich erworbenem DSC (Carbolution Chemicals GmbH) gearbeitet. Im Gegensatz zu den drei verwendeten Diazoliden konnte die Geschwindigkeitskonstante der wässrigen Hydrolyse von DSC nicht aus der Literatur ermittelt werden. DSC wurde im Gegensatz zu den Azoliden bisher ausschließlich in zweistufigen Verfahren zur wasserfreien Erzeugung von NHS-Aktivestern und deren anschließender Nutzung verwendet. Da alle verwendeten Reagenzien unter verschiedenen Reaktionsbedingungen zuerst qualitativ an Peptiden und Proteinen getestet werden sollten, um im Anschluss die Reaktionsprodukte zu charakterisieren, wurde die Kinetik der Hydrolyse von DSC vorab nicht gesondert untersucht.

5.3 Anwendung

Um die Eignung der vier ausgewählten Reagenzien CDP, CDI, CDT und DSC (Tabelle 7) zur Quervernetzung von Proteinen zu prüfen, wurde deren Reaktivität zuerst unter (für aminreaktive Quervernetzungsreagenzien mit NHS-Aktivestern) üblichen Reaktionsbedingungen getestet:

Wässrige, meist 10 μ M Proteinlösungen wurden mittels niedrig-konzentrierten (20-100 mM) amin-freien Pufferlösungen, wie HEPES- oder Phosphat-Puffer, auf pH-Werte zwischen 7 und 8 eingestellt. Nach erfolgten Vorversuchen mit bovinem Rinderalbumin wurden zwei rekombinant exprimierte und gereinigte Proteine, das p53-Protein und das GCAP-Protein, in für diese geeigneten Puffersystemen, welche zusätzlich nicht-nukleophile Reduktionsmittel (z.B. TCEP), Glycerin oder Mineralsalze (z.B. 150 mM NaCl) enthielten, erprobt (vgl. Kapitel 4.5.3). Bei Temperaturen zwischen 4 und 25°C wurden die Quervernetzungsreaktionen mit Reaktionszeiten zwischen 30 Minuten und zwei Stunden durchgeführt. Das Vorhandensein von Quervernetzungsprodukten wurde zunächst mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung überprüft (vgl. Kapitel 4.4.2). Dabei wurde das Erscheinungsbild der aufgefundenen Proteinbanden im Vergleich zur Negativkontrolle bzw. das Auftreten von neuen Proteinbanden visuell bewertet. Erfolgte Quervernetzung kann neben dem Auftreten neuer Banden auch zu einer Verbreiterung oder dem „Verschmieren“ von Banden führen. Anschließend diente die LC-MS/MS-Analyse der proteolytisch gespaltenen Proteine (vgl. Kapitel 4.4.3) zur Bestimmung der Anzahl der Quervernetzungsprodukte und der individuellen Bestimmung der quervernetzten Aminosäuren.

5.4 Vorversuche mit Rinder-Serumalbumin (BSA)

Alle vier Vernetzungsreagenzien (CDP, CDI, CDT, DSC) wurden bei verschiedenen Reaktionstemperaturen und pH-Werten mit BSA getestet. Für BSA wurden zunächst

verschiedene Reaktionstemperaturen bei hohem molarem Überschuss der Reagenzien und pH 8 untersucht. Dazu wurde bei 100- bzw. 500-fachem molarem Überschuss der Reagenzien für jeweils zwei Stunden auf Eis, bzw. einer halben Stunde bei 20°C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit Tris-Puffer (vgl. Kapitel 4.5.3) wurde das Reaktionsgemisch mittels SDS-PAGE (10%-Acrylamid-Gele) analysiert (Abbildung 25).

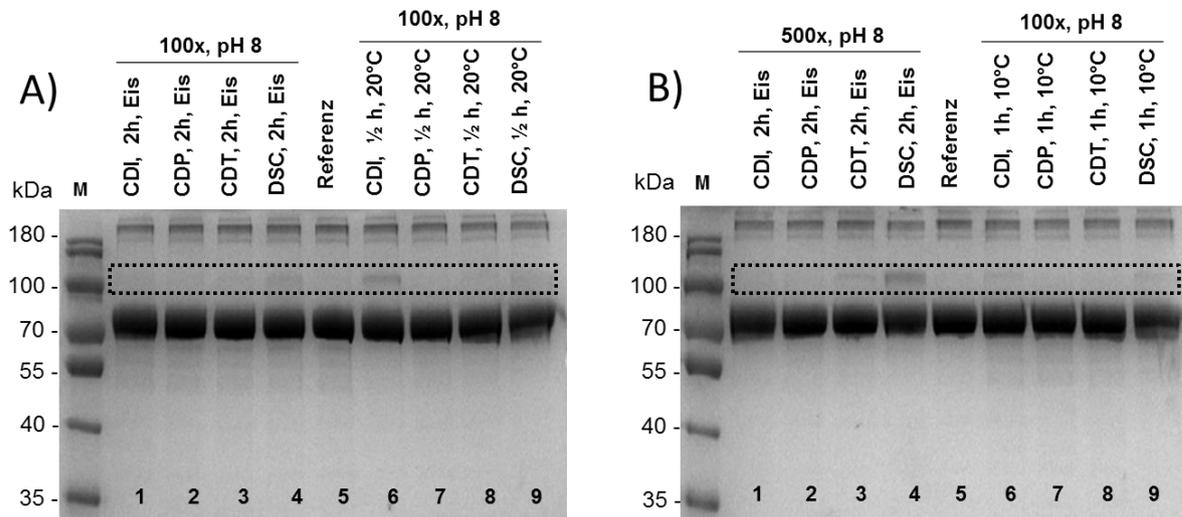


Abbildung 25 SDS-PAGE-Analyse BSA-Vernetzung mit CDI, CDP, CDT und DSC

Bereich des BSA-Dimers schwarz umrahmt

In Abbildung 25 A) sind die Vernetzungsexperimente mit jeweils 100-fachem molarem Überschuss an Quervernetzungsreagenz nebeneinander dargestellt. Spuren eins bis vier zeigen die Experimente bei zweistündiger Reaktion auf Eis. Spuren sechs bis neun zeigen die Ergebnisse für 30 min bei Raumtemperatur. Im Vergleich zur Kontrolle (Spur 5) zeigen die Ansätze auf Eis nur im Fall von DSC (Spur 4) eine klare zusätzliche Proteinbande. Für die Experimente bei Raumtemperatur zeigte sich hingegen nur für CDI (Spur 6) eine klare Bande und eine nicht eindeutige Bande für DSC (Spur 9). Da für die aus CDI entstehenden Imidazolide eine reduzierte Reaktivität bei 0°C beschrieben ist [228], wurden weitere Experimente durchgeführt, um den Einfluss der Reaktionstemperatur genauer zu untersuchen.

Dazu wurden die auf Eis durchgeführten Experimente mit auf 500-fach erhöhten molarem Überschuss an Vernetzungsreagenz wiederholt. Somit sollte selbst bei geringer Reaktivität eine definierte Proteinbande erzeugt werden. Dem gegenüber standen Experimente, die mit 100-fachem molarem Überschuss, bei auf 10°C leicht erhöhter Temperatur und einer Stunde Reaktionszeit durchgeführt wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 B dargestellt und zeigen für die Vernetzungsexperimente auf Eis nur für DSC (Spur 4) eine klare zusätzliche Proteinbande und lassen für CDT (Spur 3) eine Bande vermuten. Für die Experimente bei 10°C lassen sich nur zwei schwache Proteinbanden für CDI (Spur 6) und DSC (Spur 9) erkennen.

Um die Eignung der Reagenzien für die Quervernetzung von Proteinen besser zu beurteilen, wurde die Quervernetzung mit allen Reagenzien im nächsten Schritt bei 10-fachem molarem Überschuss, verschiedenen pH-Werten und Reaktionstemperaturen durchgeführt (0°C, 10°C und 20°C; pH 7,5 und pH 8,0). Die Proben wurden wegen der bedeutend höheren Sensitivität mittels tryptischer in-Lösung-Proteolyse (Kapitel 4.4.3) und anschließender LC-MS/MS analysiert (90 min Gradient, vgl. Kapitel 4.6.3) [177]. Die Reaktionszeit betrug für 20°C 30 min und für 0°C und 10°C je zwei Stunden. Die Datenanalyse wurde mittels der MeroX-Software ([179], vgl. Kapitel 4.3) durchgeführt. Es konnten nur mit CDI Quervernetzungsprodukte identifiziert werden (Tabelle 8, Liste der identifizierten Quervernetzungsprodukte auf CD im Anhang). In Einklang mit den Vorversuchen wurden bei 0°C Reaktionstemperatur auch für CDI keine Quervernetzungsprodukte identifiziert. Das Fehlen von Reaktionsprodukten für alle anderen Reagenzien (CDP, CDT, DSC) unter diesen Bedingungen führte dazu, dass für die folgenden Quervernetzungsexperimente ausschließlich CDI verwendet wurde.

| | 0°C pH 7,5 | 10°C pH 7,5 | 20°C pH 7,5 | 0°C pH 8,0 | 10°C pH 8,0 | 20°C pH 8,0 |
|-------------|---------------|----------------|----------------|---------------|----------------|----------------|
| CDI | - | + | + | - | + | + |
| CDP/CDT/DSC | - | - | - | - | - | - |

Tabelle 8 Bedingungen für den Nachweis von Quervernetzungsprodukten der Azolide mit BSA mittels MeroX-Analyse bei 10-fach molarem Überschuss an Reagenz

Zieht man die Hydrolysegeschwindigkeit der Azolide heran um die Reaktivitätsunterschiede zu erklären ergibt sich folgende Ratio für die beobachteten Reaktivitäten. Da die Hydrolysegeschwindigkeit des CDP kaum messbar ist (vgl. Tabelle 7) liegt generell eine unbefriedigende Reaktivität unter den Reaktionsbedingungen vor. Im Falle des CDT ist die Reaktivität gegenüber dem CDI erhöht. Dies trifft jedoch nicht nur für das eingesetzte Diazolid, sondern auch für das mit der Aminosäureseitenkette gebildete intermediäre Azolid zu. Daher ist zu vermuten das eine konkurrierende Hydrolyse sowohl des CDT als auch des Carbonyltriazolids zu schnell abläuft. Im Fall des CDI scheint die Reaktivität ab einer Mindesttemperatur von ca. 10°C gerade hoch aber noch ausgeglichen genug um eine ausreichende Quervernetzungen zu erzeugen. Obwohl im Fall des DSC Gelbanden sichtbar sind, wurden keine harnstoffbasierten Quervernetzungen gefunden. Es ist daher anzunehmen das konkurrierende Reaktivitäten (z.B. bevorzugte Vernetzung von Hydroxyl- oder Thiolgruppen, Aktivierung von Carbonsäuren) zwar Quervernetzungsprodukte erzeugen, deren Natur jedoch nicht die gewünschte Harnstoff-artige Struktur aufweisen (vgl. Kapitel 5.4.1).

Da die Reaktionstemperatur für die Anwendbarkeit von CDI mindestens 10°C betragen muss, wurden weitere Vernetzungsexperimente mit Reaktionstemperaturen von 10°C und 20°C durchgeführt. Dabei variierte der molare Überschuss an CDI zwischen 1- bis 50-fach und es wurde bei pH-Werten von 7,5 oder 8,0 gearbeitet. Die Auswertung erfolgte erneut mittels MeroX nach LC-MS/MS-Analyse und vorangegangener tryptischer in-Lösungs-Proteolyse. Es wurde jeweils mit Duplikaten gearbeitet, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse einzuschätzen. Dabei werden die Produkte die in sowohl in Replik 1 als auch 2 gefunden werden als $1 \wedge 2$ bezeichnet (\wedge ... logischer Operator „und“). Die Summe der Anzahl der Produkte die entweder in Replik 1 oder in Replik 2 gefundenen werden, sind mit $1 \vee 2$ bezeichnet (\vee ... logischer Operator „oder“). Das Verhältnis der Zahlenwerte beider Fälle wird als $(1 \wedge 2) : (1 \vee 2)$ in folgender Darstellung abgekürzt.

Es zeigte sich, dass schon beim 10-fachen molaren Überschuss an Vernetzungsreagenz eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für pH 7,5 erreicht werden konnte (Tabelle 9). Demgegenüber war die Reproduzierbarkeit der Experimente bei pH 8,0 vor allem für den Versuch bei 10°C geringer. Auffällig war die nahezu identische Anzahl an gefundenen Quervernetzungsprodukten, wenn die Replikate kombiniert wurden (Fall $1 \vee 2$) (Liste der gefundenen Quervernetzungen auf CD im Anhang).

| CDI (10-fach) | 10°C | 20°C | 10°C | 20°C |
|---|--------|--------|--------|--------|
| | pH 7,5 | pH 7,5 | pH 8,0 | pH 8,0 |
| Replik 1 | 9 | 9 | 9 | 11 |
| Replik 2 | 9 | 12 | 8 | 9 |
| Replik $1 \wedge 2$ | 8 | 9 | 6 | 8 |
| Replik $1 \vee 2$ | 10 | 12 | 11 | 12 |
| $(1 \wedge 2) : (1 \vee 2)$ | 80% | 75% | 55% | 67% |

Tabelle 9 Anzahl identifizierter Quervernetzungsprodukte von CDI mit BSA

Es wurde ein 10-facher molarer Überschuss an CDI eingesetzt.

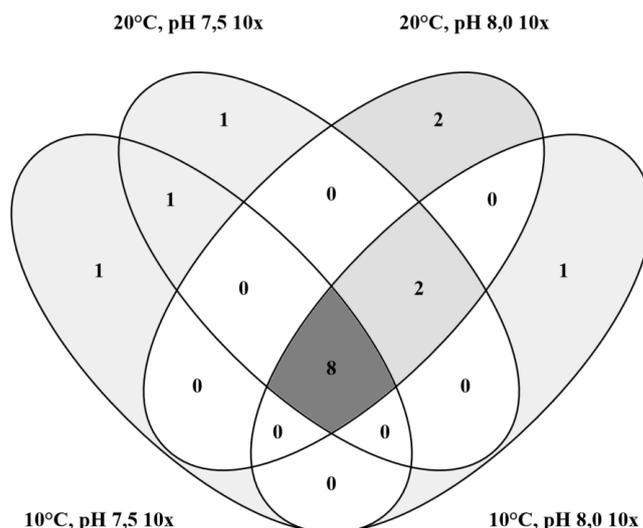


Abbildung 26 Venn-Diagramm 10-facher molarer Überschuss CDI zu BSA.

Übereinstimmung der identifizierten Vernetzungsprodukte bei 10-fachem molarem Überschuss an CDI und den kombinierten Ergebnissen der Duplikate.

Stellt man anhand der Ergebnisse der kombinierten Duplikate dar, welche Quervernetzungsprodukte unter mehreren Bedingungen identifiziert wurden (Abbildung 26), fallen drei Merkmale auf:

- Für jede gewählte Bedingung entsteht ein Vernetzungsprodukt des BSAs, das nur unter diesen Bedingungen gefunden wird. Im Fall von pH 8,0 und 20°C sind dies sogar zwei Produkte.
- Acht der gefundenen Vernetzungsprodukte wurden unter allen Bedingungen identifiziert – dies entsprach 50% aller mindestens einmal identifizierten Produkte.
- Zwei Vernetzungsprodukte wurden unter drei Bedingungen gefunden und nur bei 10°C und pH 7,5 nicht identifiziert, was 12,5% aller mindestens einmal identifizierten Produkten entsprach.
- Es konnten bei einem 10-fachen molaren Überschuss an CDI und Reaktionstemperaturen ab 10°C zehn übereinstimmende Quervernetzungsprodukte in BSA unter drei von vier Bedingungen gefunden werden (pH 7,5 und 20°C, pH 8 bei 10°C und 20°C). Dies entsprach ca. 63% aller mindestens einmal identifizierten Produkte.

Vergleicht man die Experimente eines 10-fachen mit denen eines 20-fachen Überschusses an CDI, so zeigt sich eine leicht erhöhte Anzahl an Reaktionsprodukten für den 20-fachen Überschuss an CDI bei vergleichbarer Reproduzierbarkeit zwischen den Duplikaten. Eine Ausnahme stellte das Experiment bei 20°C und pH 8,0 dar, welches mit Abstand die meisten Produkte lieferte (Tabelle 10) (Liste der gefundenen Quervernetzungen auf CD im Anhang).

| CDI (20-fach) | 10°C pH 7,5 | 20°C pH 7,5 | 10°C pH 8,0 | 20°C pH 8,0 |
|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Replikat 1 | 11 | 12 | 10 | 16 |
| Replikat 2 | 11 | 11 | 9 | 15 |
| Replikat 1∧2 | 9 | 9 | 7 | 13 |
| Replikat 1∨2 | 13 | 14 | 12 | 18 |
| (1∧2) : (1∨2) | 69% | 64% | 58% | 72% |

Tabelle 10 Anzahl identifizierter Quervernetzungsprodukte von CDI mit BSA (20-fach)

Eine Darstellung (Abbildung 27) der unter mehreren Bedingungen gefundenen Quervernetzungsprodukte zeigt im Gegensatz zu den Versuchen beim 10-fachen molaren Überschuss eine sehr hohe Überlappung der Ergebnisse.

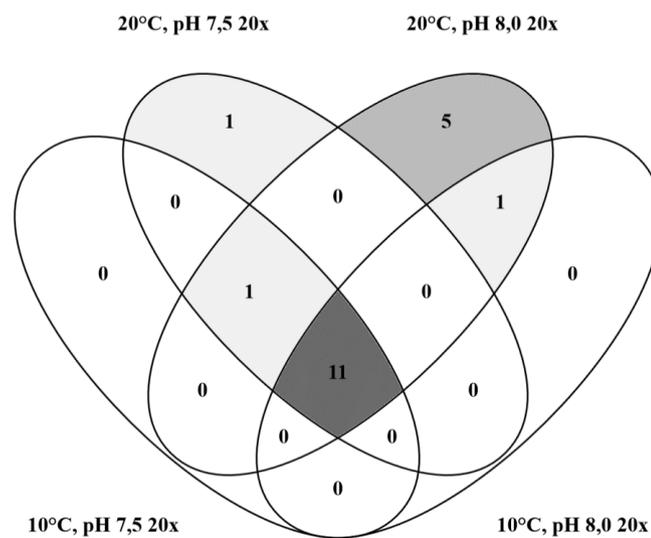


Abbildung 27 Venn-Diagramm 20-facher molarer Überschuss CDI zu BSA

Übereinstimmung der identifizierten Produkte bei 20-fachen Überschuss und kombinierten Ergebnissen der Duplikate

Elf Produkte wurden unter allen Reaktionsbedingungen gefunden (57,9% aller mindestens einmal identifizierten Produkte), zwölf sogar in drei von vier Bedingungen (63,2%), also mit gleichem Anteil wie im Fall des 10-fachen Überschuss. Es zeigte sich, dass fünf Produkte ausschließlich bei 20°C und pH 8,0 gefunden werden konnten (26,3% aller mindestens einmal identifizierten Produkte) und die Bedingungen bei 10°C und pH 7,5 keine Produkte lieferten, die nicht unter allen anderen Bedingungen auch gefunden wurden.

Stellt man die erhaltenen Vernetzungsprodukte bei 10-fachem und 20-fachem molarem CDI-Überschuss gegenüber, zeigt sich, dass bei Verwendung von 20-fachem CDI-Überschuss unter allen getesteten Bedingungen die 10 gemeinsamen Vernetzungsprodukte aus den Versuchen mit 10-fachem Überschuss gefunden wurden. Selbst die ungünstigen Reaktionsbedingungen von pH 7,5 und 10°C lieferten bei 20-fachem CDI-Überschuss also schon alle

Quervernetzungsprodukte, die im Falle des 10-fachen Überschuss unter Kombination der drei effektivsten Bedingungen gefunden wurden (63% aller gefundenen Quervernetzungsprodukte). Wie erwartet, zeigte sich hier eine Erhöhung der Anzahl identifizierter Quervernetzungsprodukte, wenn bei höheren Überschüssen, höherer Temperatur und höherem pH-Wert gearbeitet wurde.

Dieser Trend ließ sich auch beim Vergleich der kombinierten Ergebnisse der Duplikate für 50-fachen molaren Überschuss an CDI erkennen: Die häufigsten Identifikationen wurden mit 22 Identifikationen für pH 8,0 bei 20°C gefunden; gefolgt von 16 bei pH 8,0 und 10°C, 15 bei pH 7,5 und 20°C, bzw. 14 für pH 7,5 und 10°C. Auffällig ist die stark steigende Gesamtzahl an identifizierten Produkten bei der Variante pH 8,0 und 20°C im Vergleich zu allen anderen Bedingungen (Tabelle 11).

| CDI (50-fach) | 10°C | 20°C | 10°C | 20°C |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|
| | pH 7,5 | pH 7,5 | pH 8,0 | pH 8,0 |
| Replikat 1 | 12 | 14 | 12 | 19 |
| Replikat 2 | 12 | 14 | 14 | 19 |
| Replikat 1∧2 | 10 | 13 | 10 | 16 |
| Replikat 1∨2 | 14 | 15 | 16 | 22 |
| (1∧2) : (1∨2) | 71% | 87% | 63% | 73% |

Tabelle 11 Anzahl identifizierter Quervernetzungsprodukte von CDI mit BSA (50-fach, Duplikate)

Dennoch zeigen die Ergebnisse bei 50-fachen molaren CDI-Überschuss (kombinierte Duplikate), dass bei fast jeder Variante der Reaktionsbedingungen einzigartige Produkte entstanden (außer bei 20°C, pH 7,5). Ungeachtet der Temperatur zeigen die Ergebnisse für pH 8,0 drei zusätzliche Produkte verglichen mit den Versuchen bei pH 7,5. Die Reaktionsbedingungen pH 8,0 und 20°C wiesen mit sieben einzigartigen Produkten den größten Zuwachs an Reaktionsprodukten auf (Abbildung 28). Obwohl diese Bedingungen mit Abstand am meisten Produkte liefern, zeigt diese Übersicht auch, dass es keine Reaktionsbedingungen gibt, die die Gesamtheit der unter allen Bedingungen gefundenen Quervernetzungsprodukte hervorbringt.

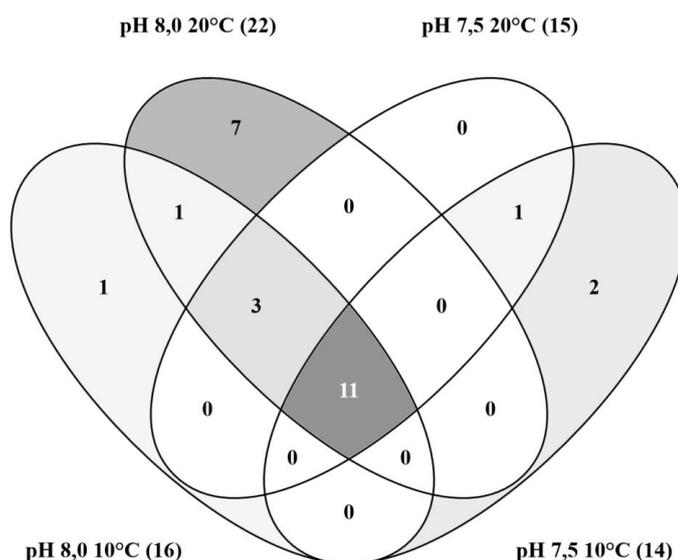


Abbildung 28 Venn-Diagramm 50-facher molarer Überschuss CDI zu BSA.

Venn-Diagramm aller gefundenen Quervernetzungsprodukte bei 50-fachen molaren Überschuss CDI zu BSA

Den Einfluss des molaren Überschusses an CDI auf die Anzahl der gefundenen Reaktionsprodukte wurde bei den Reaktionsbedingungen pH 8,0 und 20°C untersucht. In Tabelle 12 ist die Anzahl der identifizierten Quervernetzungsprodukte gegen den molaren Reagenzüberschuss aufgetragen. Dabei wird mit ‚# Cross-Links‘ die Anzahl der *hinzukommenden* Cross-Links im Vergleich zum (vorherigen) niedrigeren Überschuss angegeben. Entweder wurden nur die Identifizierungen angegeben, die in beiden Duplikaten der jeweiligen Versuchsbedingungen bestätigt wurden (in Tabelle 12, links) oder die Kombination aller Identifizierungen, welche mindestens in einem Duplikat gefunden wurden (in Tabelle 12, rechts). Es treten jedoch vermehrt einzigartige Produkte auf, die durch ihre ausschließlich einmalige Identifikation nicht mehr gesichert angenommen werden können (Werte in Klammern). Setzt man die Summe der gesichert identifizierten Produkte auf 100%, kann abgebildet werden, wie viele der Produkte prozentual schon ab welchem Überschuss entstehen (‚% Cross-Links‘). Wären noch höhere Überschüsse verwendet worden, könnten einige der „einmaligen Identifikationen“ durchaus erneut auftreten und somit als gesichert gelten und diese Übersicht somit verändern. Weiterhin ist für jeden verwendeten Überschuss die Anzahl der Produkte angegeben, die das theoretische Distanzmaximum von 15 Å (C_{α} - C_{α} -Distanz für Lysine, siehe Tabelle 13) überschreiten. Die drei im linken Teil der Tabelle 12 gefundenen Produkte bei den Überschüssen 20-fach und 50-fach (markiert mit *, ** und ***) werden im rechten Teil schon bei den niedrigeren 10-fachen und 20-fachen Überschüssen, nämlich in einem der Duplikate, nachgewiesen (Liste der gefundenen Quervernetzungen auf CD im Anhang).

| Molarer Überschuss CDI | <i>in beiden Replikaten identifiziert</i> | | | <i>aus beiden Replikaten kombiniert</i> | | |
|------------------------------|---|-------------------------|--|---|-------------------------|--|
| | # <i>Cross-Links</i> | % <i>Cross-Links</i> | # d(C _α -C _α) > 15 Å | # <i>Cross-Links</i> | % <i>Cross-Links</i> | # d(C _α -C _α) > 15 Å |
| 1 x | 2 | 12,5 | 0 | 5 | 20,8 | 0 |
| 10 x | 6 | 37,5 | 0 | 7 | 29,2 | 2*** |
| 20 x | 5 | 31,25 | 1* | 6 (2) | 25,0 | 2*** |
| 50 x[#] | 6 | 18,75 | 2*** | 6 (6) | 25,0 | 1 |
| Gesamt | 19 | 100,0 | 3 | 24 (8) | 100,0 | 5 |

Tabelle 12 Aufstellung zusätzlich auftretender Vernetzungsprodukte bei pH 8,0, 20°C und ansteigendem molarem Überschuss CDI.

#.. höchster Überschuss

().. Anzahl der ausschließlich einmalig gefundenen Produkte

*, **, ***.. drei der insgesamt fünf Produkte, die die Distanz von 15Å überschreiten

Durch den Vergleich der verschiedenen Arten der Auswertung werden folgende Auswirkungen auf die erhaltenen Ergebnisse deutlich:

- Ab einem 10-fachen molaren Überschuss an CDI werden in beiden Methoden der Auswertung schon 50% aller bei 50-fachem molarem Überschuss identifizierten Vernetzungsprodukte gefunden
- Die Produkte, welche die Distanzbeschränkungen von 15 Å des CDI formal überschreiten, treten erst bei >20-fachem molarem Überschüssen an CDI auf, wenn die Identifikation in beiden Duplikaten gefordert wird. Es zeigt sich eine ähnliche Abhängigkeit (Abfolge) des Auftretens dieser Produkte vom verwendeten Überschuss bei beiden Auswertemethoden.
- Da kein höherer molarer Überschuss als 50-fach verwendet wurde, können nicht alle Reaktionsprodukte als gesichert gelten. Sechs Quervernetzungsprodukte bei 50-fachem molarem Überschuss werden nur in einem Duplikat gefunden.
Anhand dieser Zählweise liefert die Auswertung mittels doppelt-identifizierter Spezies (linke Seite Tabelle 12) 19 Quervernetzungsprodukte und mittels mindestens einmal identifizierter Spezies (rechte Seite Tabelle 12) 24 sichere Quervernetzungsprodukte. Das striktere Auswertekriterium (Auffinden in beiden Duplikaten) lieferte demnach ca. 80% der Ergebnisse des weniger strikten Kriteriums.
- Die Anzahl an „Überlängen“-Produkten ist bei der weniger strikten Auswertemethode von 3 auf 5 Reaktionsprodukte erhöht. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen das eine Bewertung der Identifizierungen als „Überlängen“-Produkte durchaus kontrovers diskutiert wird und es keine allgemein anerkannten Kriterien für eine derartige Bewertung gibt [242].

5.4.1 Maximal überbrückbare C_α-C_α-Abstände und auftretende Spaltprodukte

Obwohl in obiger Auswertung ein C_α-C_α-Abstand von 15 Å als Distanzkriterium für CDI angenommen wurde, müssen für CDI durch die potentiellen Reaktionen mit Amin-, Hydroxy- und Thiol-Gruppen in Proteinen je nach Vernetzungspartner auch kürzere Maximaldistanzen der C_α-Atome beachtet werden. Die mittels ArgusLab [243] berechneten maximalen C_α-C_α-Abstände sind nachfolgend in Tabelle 13 angegeben.

| Max. C _α -C _α -Abstände (in Å) | Lysin | Serin | Threonin | Tyrosin | Cystein | N-Terminus |
|--|-------------|-------|----------|---------|---------|------------|
| Lysin | 15,3 | | | | | |
| Serin | 11,4 | 7,4 | | | | |
| Threonin | 11,4 | 7,4 | 7,4 | | | |
| Tyrosin | 15,4 | 11,4 | 11,4 | 15,4 | | |
| Cystein | 11,8 | 7,9 | 7,9 | 11,9 | 8,3 | |
| N-Terminus | 10,4 | 6,4 | 6,4 | 10,4 | 6,9 | 5,5 |

Tabelle 13 Maximal überbrückbare C_α-C_α-Abstände reaktiver Aminosäuren mit CDI in Å

Weiterhin hat die Vielfalt der möglichen Reaktionsprodukte Konsequenzen für die automatisierte Auswertung der Messergebnisse. In Abbildung 16 wurde der Mechanismus der Bildung der Harnstoff-typischen Spaltprodukte, einem Amin und dem korrespondierenden Isocyanat, gezeigt. Die Bildung des Isocyanats oder einer analogen Struktur ist jedoch in den Fällen der Carbonate und der Dithiocarbonate nicht möglich. Stellt man die Spaltung eines gebildeten Harnstoffs (Abbildung 29 A) der Spaltung eines (Thio-)Carbamats (Abbildung 29 B) gegenüber, wird ersichtlich, dass die Substitution des Stickstoffs durch ein Chalkogen die Bildung eines Dubletts der Massendifferenz 26 amu (vgl. Abbildung 16) verhindert.

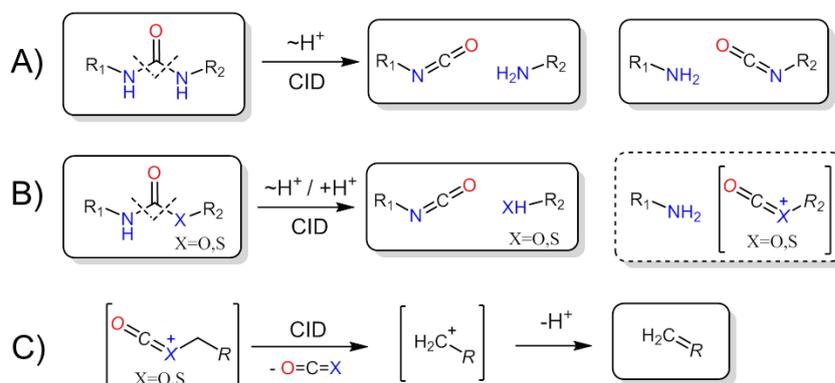


Abbildung 29 Kollisionsinduzierte Spaltung der CDI- Quervernetzungsprodukte

A) des Harnstoffs und B) des (Thio-)Carbamats

C) mögliche Deaktivierung eines instabilen Spaltprodukts durch doppelte Eliminierung

Die dem Isocyanat analogen Fragmente, welche an der Stelle des Stickstoffatoms ein Sauerstoff- oder Schwefelatom enthalten, müssten permanent geladene Carbokationen bilden (Abbildung 29 B, gestrichelter Rahmen), die sich aufgrund ihrer Instabilität durch aufeinanderfolgende Eliminierungsreaktionen stabilisieren können (Abbildung 29 C). Es ist anzunehmen, dass nach erfolgter Eliminierung von CO₂, bzw. COS, und anschließender Deprotonierung des Carbeniumions ein Alken gebildet wird. Diese Alkene, die auch für die Spaltung von Estern unter Kollisionsaktivierung gefunden wurden [244], weisen die gleiche Masse wie die unmodifizierten Peptide nach erfolgtem Neutralverlust von H₂O bzw. H₂S auf. Daher ist ihr Ursprung mittels HCD-MS/MS nicht zweifelsfrei zu belegen.

Es ist also nur bei zwei zum Harnstoff verbundenen Aminen die typische Bildung eines Dubletts aus zwei Dubletts möglich. Im Fall des (Thio-)Carbamats würde das dem Isocyanat-analoge Fragmention für jenes Peptid fehlen, welches das (Schwefel-)Sauerstoff-atom trägt. Im Fall der Carbonate und Dithiocarbonate würde man das Fehlen beider schwerer Fragmente des Dubletts erwarten. Somit könnte für keine der beiden Peptidketten die charakteristische Massendifferenz von 26 amu gefunden werden und eine automatische Auswertung anhand der typischen Fragmente der „Harnstoffspaltung“ ist nicht mehr möglich. Ist jedoch wenigstens eine Aminogruppe an der Verknüpfung beteiligt, können drei der vier komplementären Fragmentionen entstehen. Da somit mindestens ein Dublett mit 26 amu gebildet werden kann ist dennoch eine automatisierte Datenauswertung möglich, jedoch folglich nur für Quervernetzungen an denen entweder ein Lysin oder ein N-terminales Amin beteiligt sind. Die Berücksichtigung einer Anzahl fehlender Fragmentionen innerhalb der Fragmentionenspektren ist mittels MeroX-Software automatisiert möglich.

5.4.2 Analyse mittels MeroX-Software und Zuordnung der Quervernetzungsprodukte zur Röntgenkristallstruktur des Rinder-Serumalbumins

Obwohl die mittels MeroX identifizierten Spektren der Quervernetzungsprodukte manuell validiert wurden, konnte durch das Auffinden der charakteristischen Dubletts von 26 amu die in der MeroX-Software implementierte *RISE*-Funktion (*Reporter Ion Scan Event*) genutzt werden. Wie bereits dargelegt, muss innerhalb der Einstellungen zugelassen werden, dass auch bei Unvollständigkeit der Dublett-Signale eine Identifizierung in Betracht gezogen wird. Daher wurde ein fehlendes Signal erlaubt. Anderenfalls würden diese Spektren ohne weitere Prüfung verworfen und die Anzahl der erfolgreichen Identifizierungen wäre mangelhaft. Da das jeweils kleinere Spaltfragment der durch CDI gebildeten Harnstoffe bzw. Carbamate der unmodifizierten Aminosäure entspricht, wurde zur deren Kennzeichnung im Spektrum die

Bezeichnung „Pep“ gewählt. Für das entsprechend größere Fragment wurde in Anlehnung an die im Isocyanat zusätzliche Carbonylgruppe die Bezeichnung „CO“ gewählt.

In Abbildung 30 ist exemplarisch ein automatisch von MeroX annotiertes Spektrum eines dreifach geladenen Quervernetzungsprodukts von BSA abgebildet. Der angegebene m/z -Wert des Vorläuferions betrug 1129.5709 und die Abweichung zum theoretisch berechneten Wert betrug 0,34 ppm. Links oben ist das deisotopierte Spektrum abgebildet, wobei die gefundenen Fragmentationen eingefärbt und betreffend mit m/z -Wert und nach Nomenklatur der Fragmentationen eingezeichnet sind: y -Ionen sind blau, b -Ionen rot und die Fragmente der Harnstoffgruppe sind gelb eingefärbt. Unter dem Spektrum ist in ppm zu jedem identifizierten Fragmentation die Abweichung des gefundenen m/z -Wertes zum theoretischen angegeben. Rechts sind die beiden Peptidsequenzen eingezeichnet (oben beta-Peptid, unten alpha-Peptid) und die gefundenen Fragmente sind der Peptidsequenz durch L-förmige Symbole entlang des Ein-Buchstaben-Kodes zugeordnet. Anhand der Farbe der Symbole ist deren relative Häufigkeit ersichtlich – die betreffende Skala ist unten rechts abgebildet.

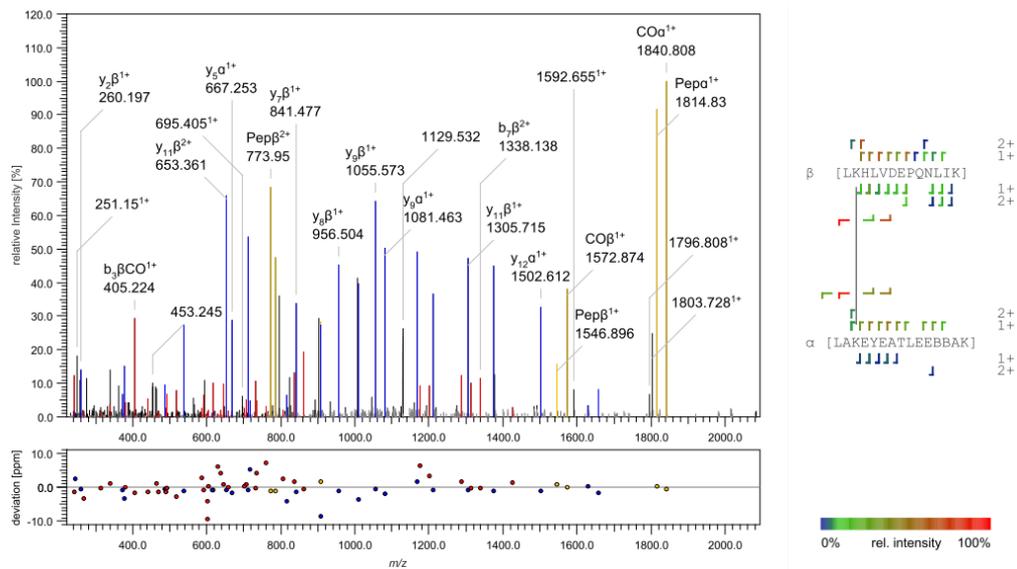


Abbildung 30 Von MeroX-Software zugeordnetes CDI-Quervernetzungsprodukt des BSA

Precursor- m/z : 1129.5709, $z=+3$, Dev. 0,34ppm, B steht im Ein-Buchstaben-Kode für oxidiertes Methionin

Entgegen oben gemachten Aussagen zur Notwendigkeit von mindestens einer an der Quervernetzung beteiligten Amingruppe konnte durch MeroX eine Ausnahme innerhalb des BSA-Datensatzes gefunden werden. Nur aufgrund der eindeutigen Zuordnung der Fragmentationen und der Quervernetzungsstelle wird betreffendes Spektrum in Abbildung 31 gezeigt. Das charakteristische und betreffende Fragment ist im Spektrum als „ $CO\beta^{1+}$ “ annotiert. Dies entspricht dem in Abbildung 29 B gezeigten, instabilen, Isocyanat-artigen Fragment des hier verknüpften Serins (formal „ $R-O^+=C=O$ “). Obwohl ein derartiger Fall in keinem der folgenden Anwendungsbeispiele wieder auftrat, muss gefolgert werden, dass je nach

Peptidsequenz und Quervernetzungsstelle Umlagerungen oder stabilisierende Einflüsse existieren können, die das „instabile“, ansonsten fehlende, Fragment der Carbamat-Spaltung detektierbar machen. Das Auffinden eines derartigen Spektrums stellt jedoch keinen Nachteil dar und sichert nur die Zuordnung der MeroX- Software durch ein weiteres Fragment des Dubletts ab.

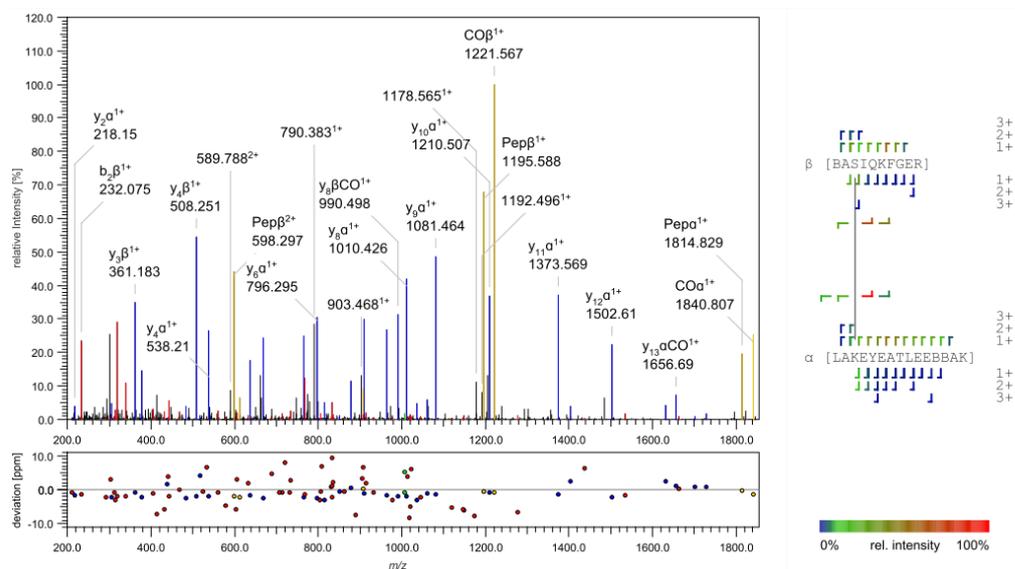


Abbildung 31 Produktionenspektrum mit unerwartetem „CO“-Fragment eines Serins

Mittels MeroX-Software zugeordnetes CDI-Quervernetzungsprodukt des BSA

Precursor- m/z : 1012.4681, $z=+3$, Dev.- 0,3ppm), B steht im Ein-Buchstaben-Code für oxidiertes Methionin

Auffallend war im Fall des BSA der besonders hohe Anteil an Quervernetzungsprodukten die eine Hydroxylgruppe und eine Aminogruppe in der Quervernetzung enthalten. Es wurden ~43% Lys-Lys-Verknüpfungen gefunden und ~ 57% Lys-Ser/Thr/Tyr-Verknüpfungen. Somit wurde die von NHS-Aktivestern bekannte Nebenaktivität der Quervernetzungsreagenzien in Bezug auf Hydroxylgruppen der Bildung reiner Amin-Amin-Quervernetzungen gleichgestellt. Dies könnte zum einen eine Eigenart der Reaktivität des CDI in Bezug auf Hydroxylgruppen sein. Zum anderen ist aber auch denkbar, dass die gebildeten Carbamate durch ihre hohe chemische Stabilität der weiteren Analyse einfach besser zugänglich sind als die bei Aktivester-basierten Reagenzien gebildeten Ester, welche bedeutend leichter hydrolysiert werden können. Andererseits ist auch denkbar, dass der Zerfall der partiell hydrolysierten Typ 0-Quervernetzungen dazu führt das vermeintlich reaktionsfähige Aminosäurepaare schlicht nicht durch teilhydrolysierte Quervernetzungen blockiert werden – schließlich werden sie ja durch die weitere Hydrolyse wieder in Freiheit gesetzt und stehen so erneut zur Reaktion zur Verfügung. Auch denkbar wäre das die mittels CDI gebildeten Carbonylazolide als reaktive Intermediate ein besonderes Reaktionsverhalten hinsichtlich der Hydroxylgruppen zeigen, oder CDI selbst eine gesteigerte Bildung der primären Intermediate mit Hydroxylgruppen zeigt.

Um die gefundenen Quervernetzungen zu validieren wurden diese mittels des Software PyMOL in eine publizierte Struktur des BSA übertragen (PDB ID: 3v03, Auflösung: 2.7 Å). Mittels der PyMOL-Software wurden daraufhin die Abstände der betreffenden C_α-Atome der vernetzten Aminosäuren eingezeichnet und deren räumlicher Abstand in Å (Abbildung 32).

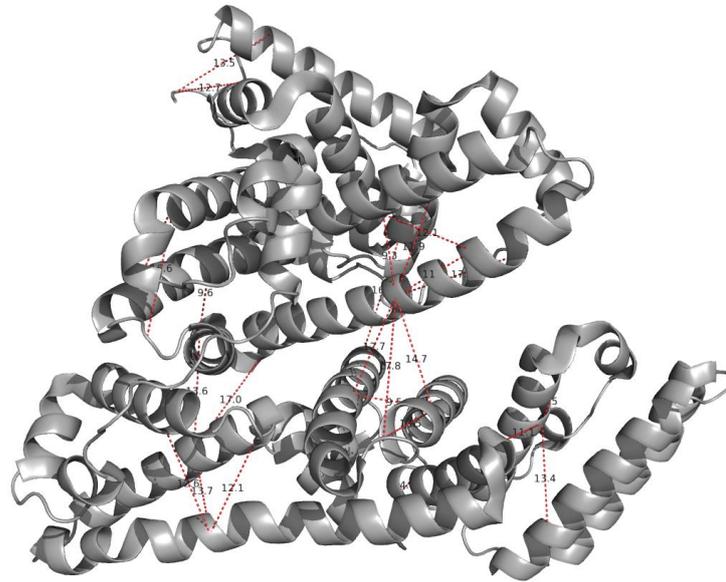


Abbildung 32 Strukturmodell des BSA mit CDI-Quervernetzungen (mod. [229])

Die Quervernetzungen sind als rot gestrichelte Linien eingezeichnet und mit ihrem räumlichen C_α-C_α Abstand in Å beschriftet.

Der gefundene mittlere C_α-C_α-Abstand betrug für das monomere BSA 12,5 Å. Der maximale identifizierte Abstand betrug 17,8 Å. Damit ist obiges strenge Kriterium von einer Maximaldistanz von 15,3 Å für eine Lysin-Lysin-Verknüpfung überschritten (vgl. Tabelle 13). Unter Berücksichtigung der Flexibilität beider Lysin-Seitenketten und der anzunehmenden Flexibilität der Proteinstruktur kann die relativ kleine Überschreitung von 2,5 Å jedoch als vernachlässigbar angesehen werden. Zudem liegt diese Abweichung unterhalb der Auflösung des Röntgen-Strukturmodells von 2,7 Å. Die bestimmten Längen der Quervernetzungen und die Längenverteilung der C_α-C_α-Abstände sind der Arbeit beiliegenden CD zu entnehmen. Die guten Übereinstimmungen legen nahe das CDI einen C_α-C_α-Abstand von ~16 Å zu überbrücken vermag. Die gefundenen Quervernetzungen stehen im Einklang mit der bekannten Proteinstruktur, so dass nicht von einer Störung der Proteinstruktur durch CDI selbst ausgegangen werden muss. Dem kommt zugute das nur niedrige molare Überschüsse verwendet werden müssen, was diese Gefahr weiter reduziert.

5.5 Vernetzung von p53 und GCAP-2 mit CDI

Um die breitere Anwendbarkeit von CDI zu demonstrieren, wurden zwei weitere Proteine mittels CDI quervernetzt und untersucht. Es handelte sich dabei um das intrinsisch ungeordnete Tumorsuppressor-Protein p53 und um das Calcium-sensitive retinale Guanylatcyclase-aktivierende Protein 2 (GCAP-2). In einer gemeinsamen Arbeit mit Dr. C. Iacobucci, A. Rehkamp und Dr. C. Arlt konnten die gewonnenen Erkenntnisse veröffentlicht werden [229]. In *E. coli* rekombinant exprimiertes, humanes, Wildtyp- p53 wurde von Dr. C. Arlt bereitgestellt bzw. GCAP-2 durch D. Tänzler und Dr. A. Rehkamp. Quervernetzungsexperimente mit p53 wurden von X. Wang durchgeführt und die Calcium-abhängigen GCAP-2-bezogenen Experimente von Dr. A. Rehkamp. An der Planung der Quervernetzungsexperimente und der Auswertung der MS/MS-Ergebnisse waren maßgeblich Dr. C. Iacobucci, X. Wang und im Fall der Calcium-abhängigen Versuche Dr. A. Rehkamp beteiligt. Das p53-Protein wurde zudem von Dr. C. Arlt bearbeitet.

Das intrinsisch ungeordnete Tumorsuppressor-Protein p53

Um der geringen Stabilität des p53-Proteins Rechnung zu tragen, wurden die Quervernetzungsreaktionen des intrinsisch ungeordneten Proteins (IDP) bei pH 7,2 und reduzierter Temperatur von 10°C durchgeführt. Das tetramere p53-Protein wirkt im Organismus als Tumorsuppressor und interagiert mit spezifischen DNA-Response-Elementen. n 40% des p53 sind intrinsisch ungeordnete Regionen (IDRs), die in einer Vielzahl von Konformationen vorliegen und neben strukturierten Domänen vorliegen. Durch Dr. C. Arlt waren schon Quervernetzungen mit dem DSBU-Reagenz [139], [140] an p53 durchgeführt wurden. Dabei zeigte sich, dass vor allem zwei Strukturmodelle des p53 mit den damals gefundenen Quervernetzungen in Einklang zu bringen sind. Zum einen da Strukturmodell nach Tidow *et al.* [245] und zum anderen das Strukturmodell nach Okorokow *et al.* [246], [247]. Die Versuche der Quervernetzung des p53 (ohne DNA) ergaben 23 Quervernetzungen in mehreren Regionen des Proteins: der C-terminalen Region, der Tetramerisierungs-Domäne und der DNA-Bindungsdomäne. Bemerkenswert waren folgende Beobachtungen: Zum einen hatten vorherige Versuche vor allem Quervernetzungen in der C-terminalen Region ergeben, in welcher die meisten Lysine des Proteins lokalisiert sind. Zum anderen wurden Quervernetzungen in der Tetramerisierungsdomäne gefunden die in den vorherigen Arbeiten nicht gefunden werden konnten. Dem gegenüber wurden die intermolekularen Quervernetzungen innerhalb des Tetramers durch DSBU nicht aufgefunden.

Die theoretischen Distanzen der verbrückten Aminosäuren wurden im Anschluss für zwei exemplarische Modellstrukturen berechnet und verglichen. Dabei ergaben die intramolekularen

Quervernetzungen für das Modell von Tidow *et al.* eine durchschnittliche überbrückte Distanz von 42,4 Å, welche die theoretisch durch CDI-vernetzung überbrückbaren Abstände von ~16 Å (vgl. Kapitel 5.4.1) weit überschreitet. Für das kompaktere Modell nach Okorokow *et al.* wurden Distanzen zwischen 6,6 und 30 Å ermittelt, wobei die durchschnittliche Distanz 19,3 Å beträgt. Jene Quervernetzungen, die eine Länge von ~16 Å überschreiten, finden sich dabei besonders in den Regionen, die von Okorokow *et al.* als flexible Loop-Regionen identifiziert wurden. (vgl. Abbildung 33).

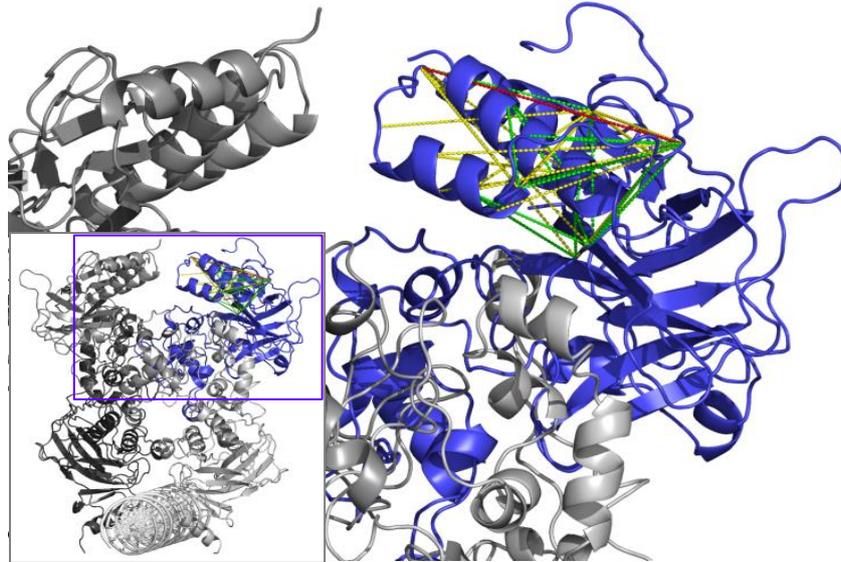


Abbildung 33 Strukturmodell des tetrameren p53 nach Okorokow *et al.* (mod. [229])

Überbrückte C_{α} - C_{α} -Abstände < 17 Å sind in grün, < 27 Å in gelb und > 27 Å in rot eingezeichnet

In einer neueren Arbeit wurde durch Kombination von MS-Techniken und Computergestütztem Modelling jedoch ein weiteres, verbessertes IDP-Strukturmodell für verschiedene Konformationen vorgeschlagen [248], welches das Modell von Okorokow *et al.* widerlegt.

Im Fall des p53 als Vertreter der Klasse der IDPs zeigen sich also einige Charakteristika des CDI als vorteilhaft: Die höhere Reaktivität vor allem auch gegenüber Hydroxylgruppen erzeugte zusätzliche Quervernetzungen die z.B. mit dem DSBU-Reagenz nicht gefunden werden konnten. Des Weiteren ist die sehr kurze überbrückbare Distanz des CDI von Vorteil, um die Trennschärfe zwischen alternativen Strukturmodellen zu verbessern. Im Vergleich zu DSBU waren die mit CDI abgeleiteten Abstandsinformationen um 33% reduziert. Dass die dem Quervernetzungsreagenz zugesprochenen Distanzbeschränkungen der maximal überbrückbaren Abstände durch flexible Proteinregionen überschritten werden können, ist einleuchtend und kann genutzt werden, um hochflexible Regionen und IDRs zu identifizieren. Das Ausbleiben der für DSBU gefundenen intermolekularen Quervernetzungen bei Verwendung von CDI lässt sich durch große Distanzen der quervernetzten Aminosäuren erklären. Es konnte hiermit die Komplementarität der durch CDI erhaltenen Informationen im

Vergleich zu anderen (Quervernetzungs-)Studien und deren Nutzen für die Strukturaufklärung gezeigt werden.

Guanylatcyclase-aktivierendes Protein 2 (GCAP-2)

Dank der hohen Stabilität des GCAP-2 wurde die Quervernetzungsreaktion des Calcium-beladenen GCAP-2 bei Raumtemperatur und einem pH-Wert von 7,5 in 20mM Hepes-Puffer durchgeführt. Das am Sehprozess beteiligte Calcium-abhängige GCAP-2 wurde in N-terminal myristoylierter und in seiner mit Calcium beladenen Form mit CDI quervernetzt. Die 19 erhaltenen Quervernetzungen wurden daraufhin mit Quervernetzungsstudien an GCPAP-2 mit BS²G von Pettelkau *et al.* verglichen. [249], [250]. Dabei konnten acht übereinstimmende Quervernetzungen identifiziert werden, von denen sechs intramolekularer und zwei intermolekularer Natur (Dimerisierung des GCAP-2) waren. Da die vorliegende NMR-Struktur des myristoylierten GCAP-2 unvollständig ist (PDB ID: 1JBA) [251], ließen sich nur drei dieser Quervernetzungen in das Strukturmodell des Monomers übertragen. Dabei ergaben sich C_α-C_α-Abstände von 14,6 – 17,4 Å. Die drei weiteren intramolekularen Quervernetzungen fanden unter Beteiligung nicht aufgelöster Bereiche im C-terminalen Teil des Proteins statt. Bei zwei weiteren Quervernetzungen zwischen den Aminosäuren S-37/T39 und K-200 bzw. K-50 und K-200/S-201 konnten die vernetzten Aminosäuren nicht eindeutig bestimmt werden. Es konnte jedoch auf eine hohe Flexibilität der C-terminalen Region des Proteins geschlossen werden. Von den neun verbleibenden Quervernetzungen, welche nur im Fall des CDI gefunden wurden, konnten zwei in Übereinstimmung mit dem verwendeten Strukturmodell gebracht werden, die sieben verbliebenen konnten jedoch nur durch die Annahme eines vorliegenden Dimers in Einklang gebracht werden. Da nur wenige Quervernetzungsprodukte das Abstandskriterium von < 16 Å strikt erfüllen und zudem Regionen des Proteins nicht im Strukturmodell enthalten sind, sowie die Existenz von Dimeren durch einige intermolekulare Quervernetzungen zweifelsfrei belegt ist, ergibt sich für GCAP-2 ein gemischtes Bild. Zum einen könnten mehrere Calcium-Beladungszustände gleichzeitig in Lösung vorliegen und somit mehrere Konformationen. Andererseits wird in der C-terminalen Region des Proteins von einer hohen Flexibilität ausgegangen, was sich im unvollständigen NMR-basierten Strukturmodell widerspiegelt. Bemerkenswerterweise scheint jedoch ein Teil der Oberfläche des Proteins besonders reaktiv oder exponiert zu sein, so dass vermehrt Quervernetzungen der Aminosäuren K-30, K-50, K-96 und K-126 bzw. K-128 auftreten. Dieser Teil der Oberfläche des Proteins kann als „abgewandte Seite“ der Calcium-Bindestellen visualisiert werden. Zur besseren Anschaulichkeit ist in Abbildung 34 die aufgespannte Fläche zwischen den drei Aminosäuren K-30, K- und K-126/K-128 grün eingezeichnet.

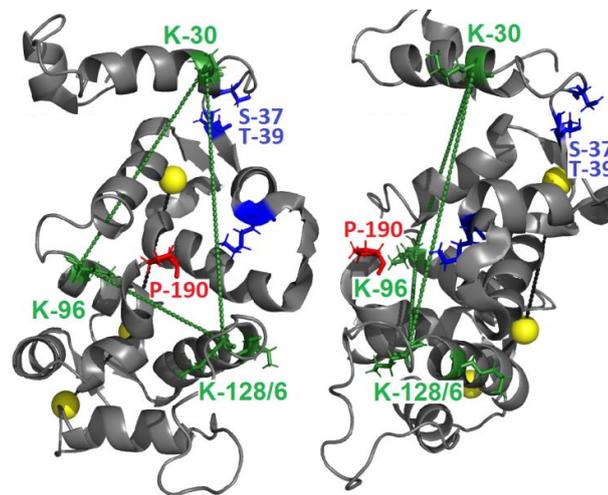


Abbildung 34 Strukturmodell des GCAP-2 (PDB ID: 1JBA, mod. [229])

Ansicht links und rechts sind um 90° gedreht. (PDB ID: 1JBA)

Letzte aufgelöste Aminosäure des Strukturmodells ist P-190 und rot dargestellt. Die Aminosäuren K-30, K-96, K-126/128 (grün) spannen ein Dreieck auf, welches die "reaktive Oberfläche" des GCAP-2 verdeutlichen soll. Die Calcium-Ionen (gelbe Kugeln) liegen auf der dazu abgewandten Seite des Proteins

Zusammenfassend konnten in beiden untersuchten Proteinen, p53 und GCAP-2, weitere, zu bisherigen Arbeiten komplementäre Quervernetzungen gefunden werden. Sowohl beim IDP p53, als auch dem retinalen Calcium-Sensorprotein GCAP-2 ließen sich unter milden pH- und Temperaturbedingungen bei niedrigen molaren Überschüssen von CDI (vgl. Kapitel 4.5.3.2) Quervernetzungen erzeugen und automatisiert identifizieren. Es entstanden bei beiden Proteinen Überlappungen der durch CDI erzeugten Quervernetzungen mit denen, welche durch NHS-basierte Aktivester, wie DSBU bzw. BS²G, erzeugt wurden. Vor allem im Fall des p53 trat die starke Neigung des CDI hervor, Quervernetzungen mit Hydroxylgruppen zu erzeugen.

6 Quervernetzung mit TEMPO-Bz-Linker

6.1 Zielstellung

Das homobifunktionelle Quervernetzungsreagenz TEMPO-Bz-Linker ist kollisionsinduziert homolytisch MS/MS-spaltbar. Die so erzeugten radikalischen Peptidfragmente können im Rahmen radikalischer Fragmentierungsreaktionen für die Peptidsequenzierung nutzbare Fragmentationen generieren (FRIPS). Diese können komplementäre Informationen zu den ansonsten durch Kollisionsinduktion erhaltenen Fragmentationen liefern. Da Vorarbeiten zum unerwarteten Fragmentierungsverhalten von TEMPO-Bz-Linker in (+)-ESI-MS/MS-Experimenten vorlagen [224], welche die Anwendung für den FRIPS-Prozess erschweren, sollten Experimente zur Fragmentierung von TEMPO-Bz-quervernetzten Peptiden in (-)-ESI-

MS/MS durchgeführt werden und die Eignung zur Peptidsequenzierung unter FRIPS-Bedingungen demonstriert werden.

6.2 Vorarbeiten unter (+)-ESI-Bedingungen

Durch Vorarbeiten wurde gezeigt, dass bei positiver Ionisation zwei Fragmentierungswege der zentralen Nitroxidgruppe des TEMPO-Bz-Linker auftreten können [224]. Es wurden in dieser früheren Arbeit mit TEMPO-Bz-Linker quervernetzte Modellpeptide und deren Natrium-Addukte untersucht. Die Ergebnisse sind hier noch einmal kurz zusammengefasst: Die ausgeprägte Gasphasenbasizität der zentralen, elektronenreichen Nitroxidgruppe des TEMPO-Bz-Linkers konkurriert mit den vernetzten Peptiden um Protonen. Ist die Gasphasenbasizität der Peptide hoch genug, so dass keine Protonierung der Nitroxidgruppe erfolgt, fragmentiert der TEMPO-Bz-Linker homolytisch zu zwei radikalischen Fragmenten. Es entstehen ein radikalisches Piperidinyloxyl-Derivat und ein radikalisches Benzylum-Derivat (Abbildung 35 A). Diese Derivate können die gewünschten radikalischen Fragmentierungsreaktionen der Peptide auslösen. Im entgegengesetzten Fall, bei bevorzugter Protonierung der Nitroxidgruppe gegenüber den Peptiden, tritt eine unerwartete heterolytische Spaltung des Reagenzes auf. Dabei entstehen zwei nicht-radikalische Fragmente: ein N-Hydroxypiperidinderivat und ein Benzylumkation (Abbildung 35 B). Diese alternativ gebildeten Fragmente unterscheiden sich von den radikalischen Produkten bei gleicher Ladungszahl um je ein Wasserstoffradikal. Untersuchungen an Quervernetzungsprodukten, deren mobile Protonen entweder vollständig durch Natriumionen ersetzt waren oder die ausschließlich Aminosäuren mit hoher Gasphasenbasizität enthielten, zeigen lediglich die homolytische Spaltung zu den zwei radikalischen Fragmenten, da keine mobilen Protonen zur Verfügung stehen, um die Nitroxid-Gruppe zu protonieren.

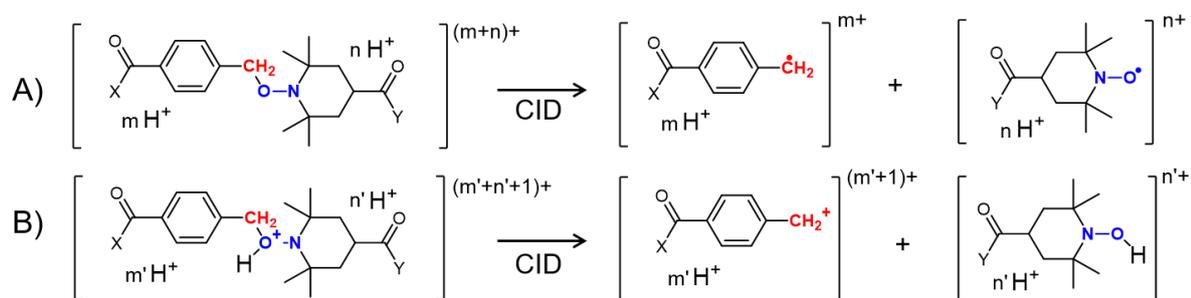


Abbildung 35 Alternative Fragmentierungsreaktion von TEMPO-Bz-Linker in (+)-ESI

X und Y stellen beliebige Peptide dar, m und n die Anzahl der auf die Fragmente übertragenen Protonen.

Da die Massendifferenz der beobachteten Fragmentierungsprodukte gering ist, wäre eine selektive weitere Fragmentierung (Trennung) bei parallelem Auftreten nur schwer möglich

(Koisolierung). Die ausbleibenden Radikale nach heterolytischer Fragmentierung führen nicht zu der gewünschten zusätzlichen Fragmentierung der Peptidketten. Zudem kann bei unbekanntem quervernetztem Peptid nicht direkt im Spektrum abgelesen werden, welche Fragmentierung vorliegt. Durch die vorangegangenen Arbeiten wurde jedoch gezeigt, dass bei erfolgter homolytischer Spaltung radikalisch erzeugte Seitenkettenfragmente der Aminosäuren nach einem Muster auftreten [252]. Sie lassen sich daher nach einem Bildungsschema für alle Aminosäuren vorhersagen [224]. Da im (-)-ESI-Modus deprotonierte Moleküle untersucht werden, ist keine Protonierung der Nitroxid-Gruppe des TEMPO-Bz-Linkers zu erwarten, so dass ausschließlich die gewünschte homolytische Spaltung des Reagenzes mit der Erzeugung der zwei radikalischen Massemodifikationen zu erwarten ist (Abbildung 36).

In dieser Arbeit sollte die Analyse der radikalischen Fragmentierungen im (-)-ESI-Modus durchgeführt werden. Da für die zu untersuchenden Seitenkettenfragmente keine geeignete Nomenklatur existierte, wurde hier eine eigene Nomenklatur der Seitenkettenverluste der Aminosäuren eingeführt. Diese wird im Folgenden für die Beschriftung aller Spektren und deren Diskussion benutzt.

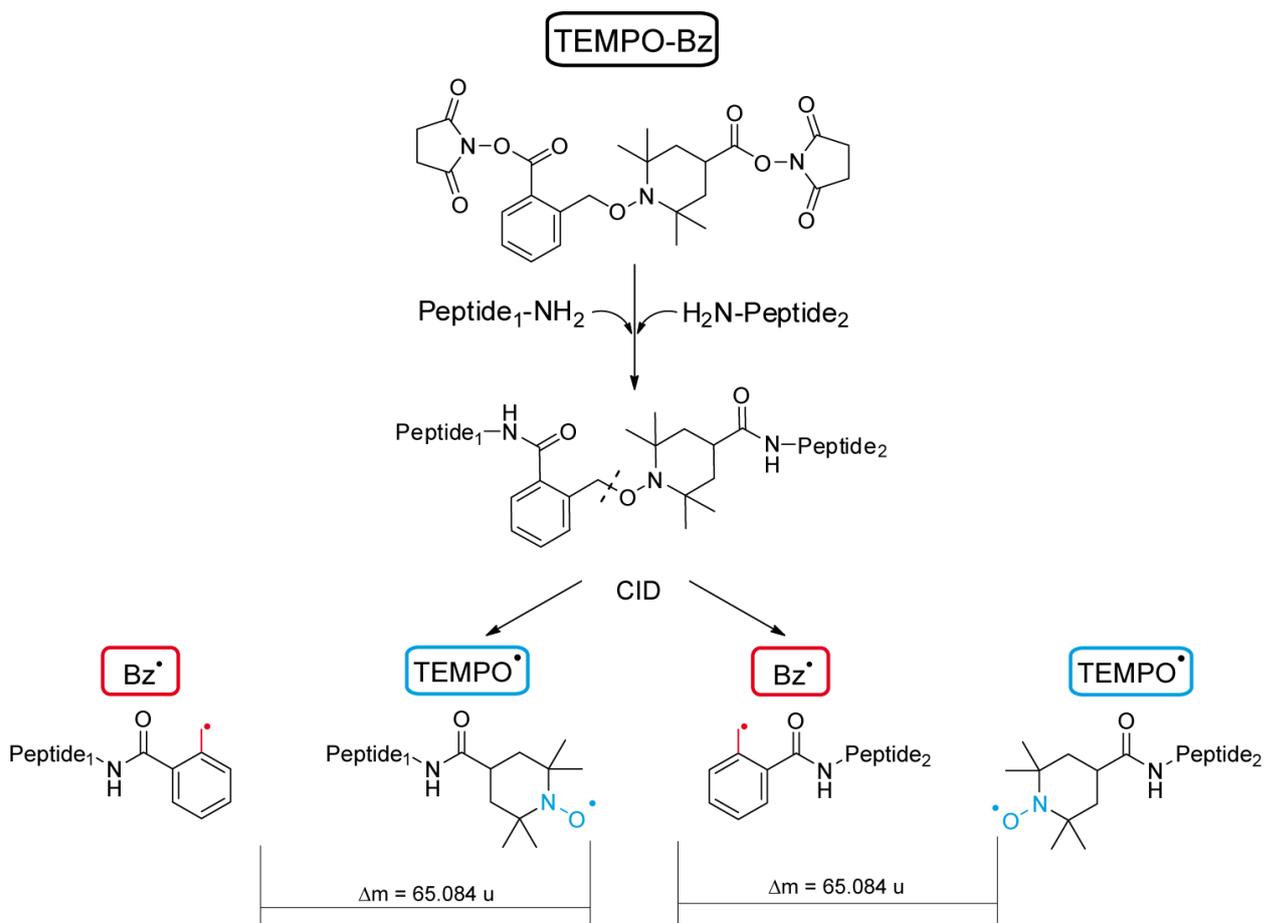


Abbildung 36 Fragmentierungsverhalten von TEMPO-Bz-Linker im (-)-ESI-Modus, mod. nach [253].

6.3 Radikalübertragung und Nomenklatur der Seitenkettenfragmente

Anhand der postulierten Entstehung der radikalischen Seitenkettenfragmente der Aminosäuren, wurde eine Nomenklatur erarbeitet, die die Aminosäure, aus dem das Fragment stammt und die Art des Fragments, kennzeichnet. Manche radikalischen Fragmente konnten aufgrund ihrer geringen Größe und mehrerer möglicher Ursprünge jedoch nicht zweifelsfrei zugeordnet werden. Daher werden- von der Nomenklatur abweichend - das Wasserstoffradikal immer als „H“ und das Methylradikal immer als „CH₃“ angegeben.

Die Seitenkettenfragmentierung der Aminosäuren erfolgte nach Hydrid-Übertragung(en) von den radikalischen Linker-Fragmenten auf die kovalent verbundene Polypeptidkette. Für das TEMPO-Fragment dominierte der Verlust eines Methylradikals. Für die das Benzyl-Fragment tragende Peptidkette wurden hingegen vielfältige Seitenkettenfragmente der Aminosäuren gefunden. Die dafür nötige „Mobilität“ des Radikalcharakters entlang der Polypeptidkette stand in Einklang mit postulierten [1,4]-Hydrid-Übertragungen entlang des Polyamidgerüsts der Peptide. In Abbildung 37 A ist eine mögliche Desaktivierung des TEMPO-Radikals gezeigt. In Abbildung 37 B ist ein möglicher Mechanismus der Übertragung des Radikals von dem verbundenen benzylischen Rest auf das Peptidrückgrat dargestellt, wobei X eine in Nachbarschaft stehende Aminosäureseitenkette kennzeichnet.

Wird der radikalische Charakter auf das C_α-Atom einer Aminosäure übertragen, können sekundäre Fragmentationen, ausgehend von der Stellung innerhalb der Peptidkette und der Art der Aminosäure, erhalten werden. Eine radikalische Fragmentierung des Peptidrückgrats führt zur Bildung von a-, x-, c- und z- Ionen, welche zur Peptidsequenzierung genutzt werden. Zusätzlich dient die auftretende charakteristische Fragmentierung der Seitenkette zur Identifizierung der Aminosäure [187]. Prinzipiell kann jede Bindung der Aminosäureseitenkette gebrochen werden. Es wurden für radikalisch-modifizierte Lysine unter anderen experimentellen Bedingungen drei verschiedene Fragmentierungen der Seitenkette gefunden [223]. Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen traten nur zwei dominierende Haupt-Fragmentierungswege der Seitenketten auf: der Bindungsbruch der C_α-C_β- sowie der C_β-C_γ-Bindungen der Seitenkette. Bei einfachen Aminosäuren wie z.B. Glycin oder Alanin, blieben die charakteristischen Fragmente aufgrund der fehlenden oder zu kurzen Seitenketten aus. Auch wenn diese Aminosäuren Fragmente der Seitenkette liefern können (H[•] und CH₃[•]), ist deren Ursprungs aufgrund ihrer Größe nicht zweifelsfrei zu belegen. Einige Seitenkettenfragmente, wie bei Leucin und Isoleucin, können zudem isobar sein, was in die Analyse der Fragmentationenspektren einbezogen werden muss.

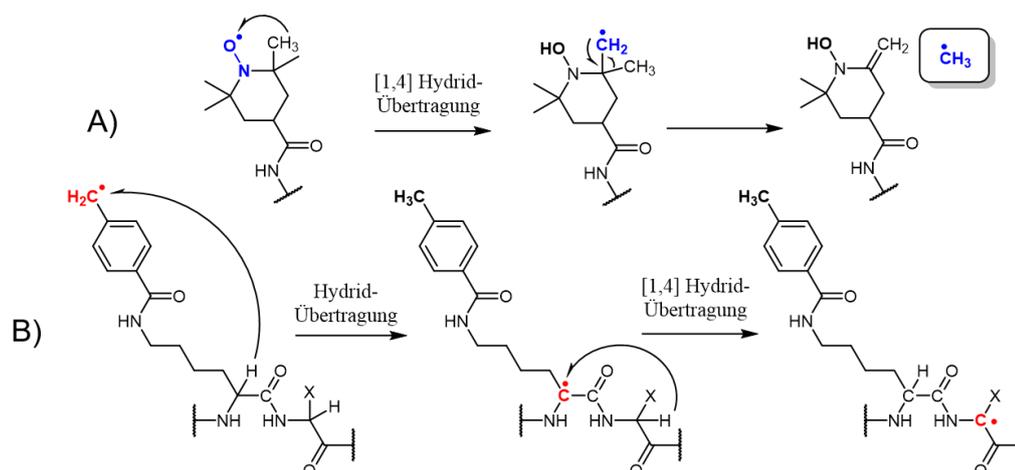


Abbildung 37 Primäre Radikalübertragungen des TEMPO- und Benzoyl-Fragments des TEMPO-Bz-Linker.

A) Desaktivierung des TEMPO-Radikals durch Abgabe eines Methylradikals.

B) Hydridübertragung vom Polypeptidgerüst auf das Benzoyl-Radikal (X bezeichnet bel. Seitenkette).

Die Seitenkettenfragmente treten als Neutralverluste auf, können aber sowohl einen radikalischen, als auch nicht-radikalischen Charakter tragen. In Abbildung 38 sind für die beobachteten Seitenkettenfragmentierungen mögliche Reaktionsmechanismen und die entstehenden Neutralverluste und Peptidkettenfragmente am Beispiel des Leucins gezeigt. Da der Bindungsbruch den Radikalcharakter des abgespaltenen Fragments bestimmt, werden die Fragmente im Folgenden nach einer selbst erarbeiteten Nomenklatur anhand der Ursprungsamino-säure und der Art des vorangegangenen Bindungsbruchs benannt: Bricht die Seitenkette der Aminosäuren an der C_α-C_β-Bindung wird das Fragment durch den Einbuchstaben-code der Aminosäure und einem angestellten „#“ gekennzeichnet. Bei diesem Bindungsbruch verbleibt der radikalische Charakter an der Peptidkette und es können weitere radikalische Fragmentierungen im Anschluss auftreten (Abbildung 38 unten). Im Gegensatz dazu wird bei erfolgtem Bruch der Seitenkette an der C_β-C_γ-Bindung dem Einbuchstaben-code der Aminosäure ein „*“ angestellt. In diesem Fall trägt das abgespaltene Fragment den Radikalcharakter, wodurch keine weiteren radikalischen Fragmentierungen der Peptidkette mehr möglich sind (Abbildung 38, oben). Die Unterscheidung, ob durch den Neutralverlust auch der Radikalcharakter „abgegeben“ wird, ist insofern wichtig, als dass damit eine Plausibilitätsprüfung der zugeordneten Fragmentierungen möglich wird. Wenn mehrere Kombinationen nacheinander erfolgter Fragmentierungen formal zu Produktionen gleichen *m/z*-Wertes führen würden, könnten Reaktionswege ausgeschlossen werden, die mehrere „Radikalverluste“ voraussetzen (Deaktivierung durch ersten Radikalverlust).

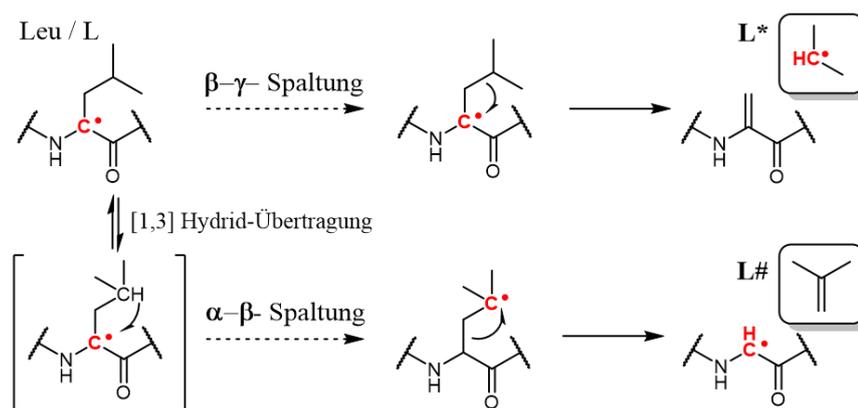


Abbildung 38 Die zwei hauptsächlich beobachteten, radikalischen Spaltungen der Aminosäureseitenkette am Beispiel von Leucin.

Da viele der abgespaltenen Seitenkettenfragmente für eine Aminosäure charakteristisch sind, kann anhand des Massenverlusts auf das Vorkommen der Aminosäure geschlossen werden. Da isomere Aminosäuren, wie Leucin und Isoleucin, unterschiedliche Seitenkettenfragmente bilden können, gelingt eine ansonsten unmögliche Unterscheidung von Leucin und Isoleucin durch das Auftreten der charakteristischen Seitenkettenfragmente von „L*“ bzw. „I*“. Werden nicht-radikalische Fragmentierungstechniken verwendet, ist dies nicht möglich. Zusätzlich zu den zwei typischen Bindungsbrüchen der Seitenketten wurde für Arginin ein drittes Fragment der theoretischen Masse 43.0296 u gefunden. Die chemische Struktur (Carbodiimid- bzw. Formamidin-Radikal) dieses Fragments verbleibt unklar. Seine elementare Zusammensetzung wurde jedoch durch die hochaufgelöste Masse als CN_2H_3^* bestimmt und sein Ursprung daher als Bruch des im Arginin enthaltenen Guanidins gedeutet. Dieses Fragment wird im Weiteren als „R§“ gekennzeichnet. Eine Übersicht der Fragmente anhand einiger Beispiele ist in Abbildung 39 dargestellt. „K-Bz“ steht dabei für ein zuvor quervernetztes Lysin, welches nach Spaltung des TEMPO-Bz-Linkers die benzoylische Modifikation trägt.

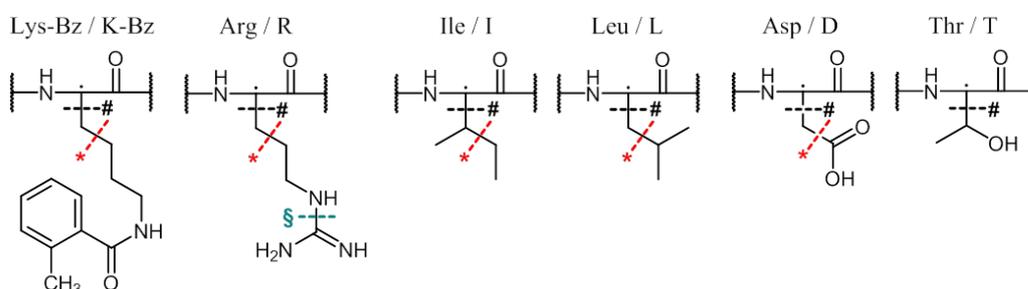


Abbildung 39 Ausgewählte Beispiele der abgespaltenen Seitenkettenfragmente.

Es ergeben sich weitere Ausnahmen von der eingeführten Nomenklatur. Manche Seitenkettenfragmente entsprechen anderen, den häufig in (-)-ESI auftretenden Neutralverlusten. Am Beispiel des Aspartats sei dies verdeutlicht: Das Fragment „D*“ entspricht formal dem Verlust von CO_2 und einem Wasserstoffradikal. Da die negativ geladenen Molekülonen im (-)-ESI aber durch Deprotonierung entstehen, liegen einige der

Carbonsäuren deprotoniert vor. Zudem wird im (-)-ESI-Modus häufig CO₂ von sauren Aminosäuren abgespalten. Eine Unterscheidung zwischen CO₂-Neutralverlust und nachfolgendem Verlust eines Wasserstoffradikals oder dem gesamten Verlust des Seitenkettenfragments ist nicht möglich. Andere Fragmentierungen sind durch intramolekulare Verbrückung zwar möglich, aber nicht nachweisbar. So sind im Fall des Prolins beide Bindungsspaltungen denkbar, aber der Verlust eines Fragments unmöglich. Andere Spaltungsreaktionen sind zwar prinzipiell möglich, aber unwahrscheinlich, da sie der Generierung eines hochreaktiven Radikals (z.B. des Hydroxyl-Radikals im Fall „S*“ oder „T*“) entsprechen würden. Es werden daher nicht für alle Aminosäuren alle laut Nomenklatur möglichen Seitenkettenfragmente betrachtet. Die typischen Fragmente der Aminosäuren und der von ihnen verursachten Neutralverluste sind in Tabelle 16 (Anhang) angegeben. Die nicht beobachteten Fragmente sind ausgespart.

6.4 Testung an Peptiden

Um die FRIPS-basierte Fragmentierung des homobifunktionellen, TEMPO-basierten Quervernetzungsreagenzes zu untersuchen, wurden drei Peptide ausgewählt. Diese entsprechen nicht den in [224] verwendeten Modellpeptiden, da für eine gute Ionisierung im (-)-ESI-Modus ausreichend viele saure Aminosäuren vorliegen müssen. Den Ausgangspunkt bildete das humane Angiotensin II, mit der Aminosäuresequenz DRVYIHPF, welches gut sowohl im (-)- als auch im (+)-ESI-Modus ionisiert werden kann. Obwohl Angiotensin II zuvor nicht mittels TEMPO-Bz-Linker untersucht worden war, liegen dafür FRIPS--Referenzdaten im (+)- und (-)-ESI-Modus vor [252]. Mittels des *Labeling*-Reagenzes („o-TEMPO-Bz-NHS“, Abbildung 12 C) wurde die FRIPS- Fragmentierung von N-terminal modifiziertem Angiotensin II für beide Polaritäten untersucht. Dies ermöglicht den Vergleich der Fragmentierung und der erhaltenen Sequenzdaten zwischen bifunktionellem TEMPO-Bz-Linker und dem in [224] verwendeten, monofunktionellen Labeling-Reagenz.

Als zweites Peptid wurde das kommerziell erhältliche, N-terminal acetylierte, „Testpeptid 1“ mit der Sequenz Ac-TRTESTDIKRASSREADYLINKER verwendet. Durch die fünf vorhandenen tryptischen Spaltstellen und die zwei enthaltenen Lysine eignet es sich in besonderer Weise zur gezielten Erzeugung von Typ 2-Quervernetzungsprodukten: Die zwei verbundenen tryptischen Peptide tragen je zwei saure Aminosäuren, decken in ihrer Zusammensetzung zehn verschiedene Aminosäuren ab und enthalten sowohl Leucin als auch Isoleucin. Die Durchführung der tryptischen Proteolyse ähnelt dabei einer für Proteine üblichen Probenvorbereitung.

Weiterhin wurde das Fragment (18-39) des humanen adrenocorticotropen Hormons (ACTH) mit der Sequenz RPKVKVYPNGAEDESAEAFPLEF verwendet. Es weist einen niedrigen pI von $\sim 4,25$ auf und trägt neben einem Lysin fünf saure Aminosäuren. Somit sind hohe Ladungszustände der Quervernetzungsprodukte im (-)-ESI-Modus zu erwarten. Die verwendeten Peptide sind in Tabelle 17 links (Anhang) dargestellt. Dabei sind basische Aminosäuren blau, saure Aminosäuren rot markiert. Im Fall von Testpeptid 1 sind die durch Proteolyse entfernten Sequenzabschnitte unterstrichen und die Werte der unmodifizierten tryptischen Peptide zusätzlich angegeben. In Tabelle 17 (Anhang) rechts sind die erwarteten Typ 2-Quervernetzungsprodukte mit Quervernetzungsstelle dargestellt. Für Testpeptid 1 ist nur das zu erwartende tryptische Peptid angegeben. Die *Precursor-m/z*-Werte der Typ 2-Produkte sind in Tabelle 18 (Anhang) aufgeführt. Für die vergleichenden Untersuchungen werden intramolekulare Quervernetzungen (Typ 1) und hydrolysierte, bzw. amidierte Spezies (Typ 0) mit einbezogen (Tabelle 19, Anhang).

6.5 FRIPS von Angiotensin II

Das Vorliegen von Referenzspektren des Angiotensins II bietet die Möglichkeit, das Fragmentierungsverhalten des TEMPO-Bz-Linkers mit einem analogen *Labeling*-Reagenz zu vergleichen [252]. Da Typ 0-Quervernetzungsprodukte der Struktur des *gelabelten* Angiotensins am nächsten kommen, wurden für den Vergleich der Fragmentierung Typ 0-Quervernetzungsprodukte verwendet. Im Anschluss wurde die Fragmentierung der Typ 2-Quervernetzungsprodukte untersucht, welche für die spätere Anwendbarkeit maßgeblich ist.

6.5.1 Vergleich der Fragmentierung zum TEMPO-Benzyl-Labeling Reagenz mittels Typ 0-quervernetztem Angiotensin II im (+)- und (-)-ESI-Modus

Die untersuchten Typ 0-Produkte enthalten eine Peptidkette und ein Hydrolyse- bzw. Ammonium-Produkt des zweiten Aktivesters. Im Fall der Hydrolyse ist dies eine deprotonierbare Carbonsäure. Im (-)-ESI liegt damit ein zusätzliches Protomer vor, dessen Einfluss auf das Fragmentierungsverhalten nicht ausgeschlossen werden kann. Für (-)-ESI-Messungen wurde daher das durch Reaktion von Peptid, TEMPO-Bz-Linker und dem mit Ammoniumbicarbonat entstandenem *Quenching*-Produkt, ein Amid, verwendet. Im (+)-ESI-Modus wurde hingegen das hydrolysierte Typ 0-Produkt untersucht. Die für das *Labeling*-Reagenz publizierten Ergebnisse wurden mittels ESI bei einer Flussrate von $3\mu\text{L}/\text{min}$ bei einer Kapillarspannung von $\pm (4,5-5,5\text{ kV})$ erhalten, wobei die Temperatur der Transferkapillare auf 200°C eingestellt wurde. Es wurde ein Ionenfallen-Massenspektrometer (LCQ Deca, Finnigan, CA, USA) und eine Kollisionsenergie zur Fragmentierung von $30-60\text{ eV}$ verwendet [252]. Lee

et al. führten zuerst bei positiver und negativer Polarität CID-MS/MS Experimente durch - die im Detail verwendeten Kollisionsenergien sind jedoch nicht eindeutig angegeben. Im Fall des (+)-ESI-Modus wurden im MS/MS keine ausreichend intensiven Fragmentationen detektiert. Daher wurde das im MS/MS gebildete Fragmentation des benzoylisch modifizierten Peptids einer weiteren Fragmentierung (CID-MS³) unterzogen. Der vorliegende Datensatz enthält daher Fragmentationen für CID-MS/MS und MS³ in (-)-ESI und für (+)-ESI nur Fragmentationen des MS³. Bemerkenswert ist das Ausbleiben einiger Fragmente im (-)-ESI-MS³ obwohl diese im MS/MS identifiziert wurden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen unterscheiden sich von dem experimentellen Aufbau Lee's: Die Proben wurden mittels Goldbeschichteten Glaskapillaren „offline“ ionisiert. Es erfolgte demnach eine nano-ESI (Nanospray Flex Ion Source, Thermo Fisher Scientific) bei bedeutend niedrigerer Kapillarspannung (+1,3 kV, bzw. -1,2 kV). Gleichzeitig lag eine erhöhte Einlasstemperatur von 275°C vor und es wurden ausschließlich CID-MS/MS- Experimente durchgeführt. Dazu wurde im verwendeten Orbitrap Fusion Tribrid- Massenspektrometer eine Isolation des Vorläuferions im Quadrupol durchgeführt (Isolationsfenster 2 Da). Es erfolgte die Fragmentierung in der Ionenfalle des Massenspektrometers mit konstanter Kollisionsenergie (CID, 25% NCE für (+)-ESI und 30% NCE für (-)-ESI) und eine anschließende Massendetektion im Orbitrap Massenanalysator (Auflösung R = 120.000 bei m/z 200). Somit wurden im Gegensatz zu Lee, der nur Nominalmassen zur Identifizierung verwendete, hochaufgelöste Daten der Fragmentationenspektren erhalten. In Tabelle 14 werden die identifizierten Fragmentationen den Ergebnissen der *Labeling*-Studien gegenübergestellt. Die benzoylisch modifizierten Ionen werden hier verkürzt angegeben: „a4(Bz•)“ steht z.B. für ein a4⁺-Ion, welches am N- Terminus noch die benzoylische Modifikation trägt. Der Nomenklatur von Roepstorff und Fohlmann folgend wird eine um ein Wasserstoffatom erhöhte Masse mittels eines Apostrophs gekennzeichnet [102], wobei die Fragmentationen nach der gängigen, durch Biemann vereinfachten, Nomenklatur benannt sind [105]. Spezies, die in den *Labeling*-Studien nicht beschrieben wurden, werden mit „---“ gekennzeichnet. Spezies die hingegen in *Labeling*-Studien gefunden aber durch Fragmentierung von TEMPO-Bz-Linker nicht detektiert werden konnten, werden mit „n.d.“ gekennzeichnet. In Tabelle 14 sind neben den jeweiligen links angeordneten Fragmentationen mittig die Ergebnisse im (+)-ESI- und rechts die Ergebnisse im (-)-ESI-Modus dargestellt. Der Ursprung der in [252] veröffentlichten Fragmente ist mit MS/MS bzw. MS³ gekennzeichnet. Die hier gefundenen hochaufgelösten Massen sind nebenangestellt, beim Auffinden mehrerer Fragmentationen (z.B.: x5 und x5') werden beide aufgeführt.

Für (+)-ESI- Bedingungen wurden elf Fragmentationen gefunden. Im Vergleich dazu stehen sieben Fragmentationen, die Lee *et al.* postulierten. Zwei der von Lee *et al.* angegebenen Ionen

(z6 und b5(Bz•)) konnten nicht identifiziert werden, jedoch sechs zusätzliche Ionen. Die Verwendung von MS³ anstatt von MS/MS durch Lee *et al.* (niedrige Signalintensitäten im MS/MS) könnte diese gravierenden Unterschiede erklären. Im Gegensatz dazu stimmen die Funde im (-)-ESI gut überein. Analog zum (+)-ESI wurde das Fragment b5(Bz•) nicht identifiziert. Das von Lee *et al.* identifizierte x4- Ion kann nicht zweifelsfrei zugeordnet werden, da das gefundene Fragmentation eine um zwei Wasserstoffatome erhöhte Masse aufweist. Das Auftreten dieses hypothetischen x4''-Ions wäre höchst ungewöhnlich, so dass dieses Signal als nicht zugeordnet gilt. Hingegen konnten das z4- Ion und das x6- Ion schon in MS/MS-Experimenten gefunden werden - obwohl von Lee *et al.* erst im MS³ identifiziert.

| Fragment | (+)-ESI von [Pep + XL + H ₂ O + H] ⁺ | | (-)-ESI von [Pep + XL + NH ₃ - H] ⁻ | |
|----------|--|------------------------------|---|---------------------------------|
| | Publiziert in [252] | MS/MS (m/z) | Publiziert in[252] | MS/MS (m/z) |
| a3'(Bz•) | MS ³ | 461,250 | --- | --- |
| c3'(Bz•) | --- | 506,271 | --- | --- |
| x4 | --- | --- | MS/MS | ? [x4''] ⁻ : 539,262 |
| z4 | --- | --- | MS ³ | [z4]• ⁻ : 495,249 |
| a4(Bz•) | MS ³ | 624,313 | MS/MS | 622,299 |
| a5 | --- | [a5] ⁺ : 619,355 | --- | --- |
| c5 | MS ³ : c5(Bz•) | [c5] ⁺ : 664,377 | --- | --- |
| x5 | --- | --- | MS/MS | [x5] ⁻ : 700,310 |
| z5 | --- | schwach: 660,205 | --- | [x5']• ⁻ : 701,318 |
| a5(Bz•) | MS ³ | 737,397 | MS/MS | [z5]• ⁻ : 658,312 |
| b5(Bz•) | MS ³ | n.d | MS/MS | 735,384 |
| x6 | --- | --- | MS ³ | n.d |
| z6 | MS ³ | n.d | MS ³ | [x6] ⁻ : 799,379 |
| a6(Bz•) | MS ³ | 874,456 | MS/MS | [z6]• ⁻ : 757,381 |
| y7 | --- | [y7] ⁺ : 931,513 | MS/MS, MS ³ | 872,442 |
| x7 | --- | [x7]• ⁺ : 958,499 | MS/MS, MS ³ | [y7] ⁻ : 929,500 |
| z7 | --- | [z7] ⁺ : 915,495 | --- | --- |
| | | | MS/MS, MS ³ | [z7'] ⁻ : 913,481 |

Tabelle 14 Fragmentationen von Typ 0- quervernetzten Angiotensin II in (+)- und (-)-ESI

(Bz•) steht für eine benzoylische Modifikation

--- kennzeichnet Fragmente, die nicht durch Lee *et al.* gefunden wurden

n.d. kennzeichnet Fragmente, die bei Lee *et al.* beschrieben, aber nicht detektiert wurden

6.5.2 Typ 2-quervernetztes Angiotensin II in (-)-ESI

Die Fragmentierung des zweifach deprotonierten Typ 2- Quervernetzungsprodukts von Angiotensin II wurde mit der des einfach deprotonierten Typ 0- Produkts im (-)-ESI verglichen. Dazu wurden bei nahezu gleichen experimentellen Parametern die Vorläuferionen des m/z-Wertes 1194,103 in der Ionenfalle fragmentiert (CID, 25% NCE statt 30%) und im Fragmentationenspektrum im Orbitrap Massenanalysator aufgezeichnet. Es konnten fast alle Fragmentationen des Typ 0- Versuchs reproduziert werden, jedoch wurden das x6- Fragment und das x5- Fragment nicht gefunden - jedoch das x5'- Fragment. Das erhaltene

Fragmentationenspektrum ist in Abbildung 40 abgebildet. Die einfach geladenen homolytischen Spaltprodukte des TEMPO-Bz-Linkers sind als $[(\text{TEMPO}^\bullet\text{-Angio}) - \text{H}]^-$ und $[(\text{Bz}^\bullet\text{-Angio})\text{-H}]^-$ bei m/z 1226,645 bzw. 1164,561 gekennzeichnet (vgl. Tabelle 20, Anhang). Für Beide werden Signale mit Wasserverlust beobachtet. Besonders das benzoylisch-modifizierte Fragmention zeigt weitere Neutralverluste wie CO_2 , CH_3^\bullet und Seitenkettenverluste des Arginins (m/z 1018 bzw. 1058). Gleichzeitig dominiert die radikalische Fragmentierung der Peptidketten zu x- und z-Ionen sowie den benzoylisch modifizierten a- Ionen, wobei ein einziges y- Ion (y_7) gefunden wird. Im Gegensatz zur Fragmentierung von Typ 0- Produkten sind die zwei höchsten Signale besonders bemerkenswert: das des unmodifizierten Peptids (m/z 1044,527) und ein Signal, welches genau dem Vorläuferion nach Verlust einer intakten Peptidkette entspricht (m/z 1343,678). Letzteres, als $[\text{M} - \text{Angio} - \text{H}]^-$ gekennzeichnetes Signal, wäre dem Typ 1-Quervernetzungsprodukt isobar. Zudem existieren zwei kleinere Signale, die einem Ammonium-Addukt, bzw. einem Wasserverlust entsprechen (m/z 1360,705 bzw. 1325,667).

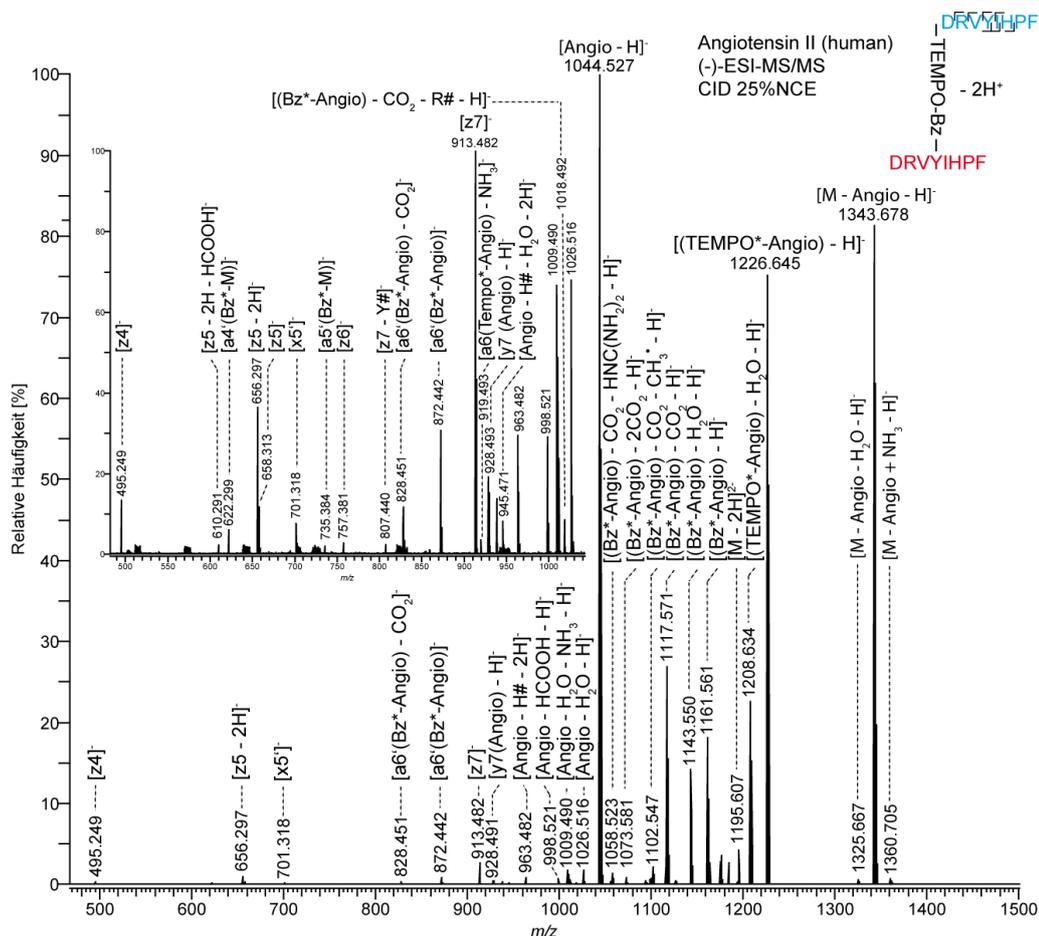


Abbildung 40 CID-MS/MS des Typ 2-Quervernetzungsprodukts von Angiotensin II und TEMPO-Bz-Linker (Vorläuferion m/z 1194,600), mod. nach [254]

6.6 Unerwartete Fragmentierung von vernetztem Angiotensin II und ACTH

Bei der Untersuchung des Angiotensin II Typ 2-Cross-Linking-Produkts konnte nicht ausgeschlossen werden, dass zumindest teilweise ein Gasphasenaddukt aus freiem Peptid und dem Typ 1-Produkt koisoliert wurde. Gasphasenaddukte sind nicht kovalent, sondern nur durch nicht-kovalente Wechselwirkungen aneinandergelagert. Daher ist die Kollisionsenergie, die benötigt wird, um sie zu trennen, in der Regel bedeutend geringer als die zur Fragmentierung nötige Kollisionsenergie. Bei einer (für Gasphasenaddukte hohen) Kollisionsenergie von 15% wurden die Ionen des freien Peptids und des Typ 1- Produkts mit einer Intensität von 1-2 % gefunden. Bei einer Kollisionsenergie von 17-18% NCE wurden die zwei Ionen mit 10% relativer Häufigkeit detektiert, wobei das TEMPO-Bz-Linker ab 19% NCE erste Fragmentionen zeigte. Im Rahmen der resonanten Anregung innerhalb der Ionenfalle (*resonance type CID*) wird nur das selektierte Vorläuferion angeregt. Dies ist anhand von Abbildung 40 gut ersichtlich, da anstatt der exakten Masse des Vorläuferions (m/z 1194) nur noch ein Isotopenpeak mit erhöhter Masse (m/z 1195) detektiert wird (selektive Anregung des ausgewählten Vorläuferions führt zum Ausbleiben der Fragmentierung höherer Isotope). Die gefundenen Fragmentionen des Typ 2- Produkts können somit sicher zugeordnet werden, da das freie Peptid bzw. das hypothetische Typ 1- Produkt, keine sekundäre Anregung erfahren, bzw. keine modifizierten Fragmentionen bilden können (freies Peptid trägt keine Modifikation, Typ 1- Produkt bleibt nach Fragmentierung verbunden). Weiterhin ist das Auftreten eines Ammoniumaddukts an dem hypothetischen Typ 1- Produkt nicht durch die Fragmentierung eines Gasphasenaddukts zu erklären. Ein gewisser Teil der beobachteten Fragmentierung des Typ 2- Produkts steht also im Gegensatz zu den Beobachtungen bei den Typ 0- Produkten. Denkbar wäre eine Interaktion der zwei N-terminal quervernetzten Aspartate, die zum Abspalten einer intakten Peptidkette an der Quervernetzungsstelle führte. Der Verlauf dieser Fragmentierungsreaktion und die Struktur des entstehenden Typ 1-artigen Fragments verblieben bei diesem angenommenen Mechanismus unklar. Untersuchungen des gebildeten einfach geladenen Fragmentions waren aufgrund mangelnder Fragmentierung im MS^3 ergebnislos.

Im Anschluss an Angiotensin II sollte ACTH quervernetzt werden, um ein Modellpeptid mit sehr vielen sauren Aminosäuren und somit hohem zu erwartenden Ladungszustand zu untersuchen. Die Fragmentierung des dreifach deprotonierten Typ 2- Quervernetzungsprodukts (m/z 1742,517, vgl. Tabelle 18, Anhang) zeigte auch hier den unerwarteten Verlust jeweils einer Peptidkette (Abbildung 41). Aus dem dreifach geladenen Vorläuferion entstanden dabei zwei komplementäre Paare des unmodifizierten Peptids $[ACTH - nH]^n$ und des korrespondierenden,

zum Typ 1 – Produkts isobaren, Fragment $[M - \text{ACTH} - (3-n)\text{H}]^{(3-n)-}$ (vgl. Tabelle 19, Anhang). Das Spektrum ist in Abbildung 31 dargestellt. Schematisch ist das Quervernetzungsprodukt mit der Fragmentierungsstelle am TEMPO-Bz-Linker eingezeichnet. Es wurde davon ausgegangen, dass die Lysine quervernetzt sind. Die auftretenden schwachen Signale konnten der Peptidsequenz nicht zugeordnet werden (vgl. Tabelle 20, Anhang).

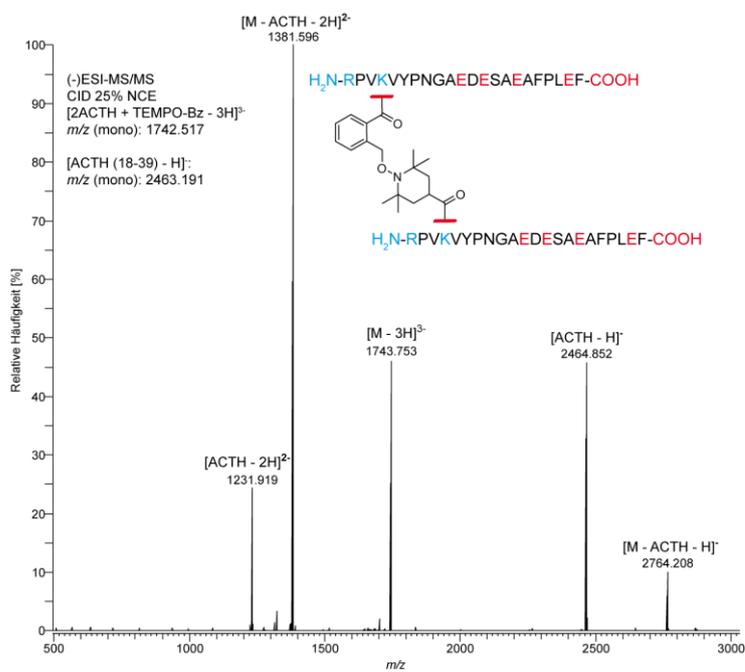


Abbildung 41 CID-MS/MS des Typ 2– Quervernetzungsprodukts von ACTH (18-39) und TEMPO-Bz-Linker (Vorläuferion m/z 1742,170), mod. nach [254]

6.7 FRIPS von Testpeptid 1

Als drittes Modellpeptid wurde „Testpeptid 1“ (TP1) untersucht. Durch seine ausgewogene Aminosäurezusammensetzung eignet es sich besonders gut zur Testung von Quervernetzungsreagenzien und anschließender tryptischer Proteolyse. Die bevorzugt reagierenden Lysine im N-terminalen (Position 9) und C-terminalen Teil (Position 22) des Peptids sind nach erfolgter Proteolyse jeweils Teile von zwei neu entstandenen Peptiden der Sequenzen TESTDIKR und EADYLINKER. Somit ergeben sich nach Quervernetzungsreaktion und anschließender Proteolyse in hohen Ausbeuten Typ 2-Quervernetzungsprodukte aus zwei unterschiedlichen Peptiden (vgl. Tabelle 17 und Tabelle 18, Anhang). Die Orientierung des Quervernetzungsreagenzes während der Reaktion führt nach der Fragmentierung der Typ 2-Produkte zu je zwei Spezies pro Peptid, je nachdem, ob das Peptid an der benzoylischen Gruppe des Reagenzes oder an der TEMPO-Gruppe gebunden ist. Somit entstehen nach der Fragmentierung des Quervernetzungsreagenzes im Gegensatz zu den vorher untersuchten Fällen zwei Dubletts (für jedes Peptid ein Dublett), wie es bei Protein- und Peptidgemischen (nach Proteolyse) beobachtet wird (vgl. Tabelle 20, Anhang). Damit eignet

sich Testpeptid 1 besonders, um die automatische Auswertung von Fragmentationenspektren mittels der MeroX Software zu demonstrieren. In Abbildung 42 ist das (-)-ESI-Massenspektrum der erhaltenen Reaktionsprodukte abgebildet. Zur besseren Lesbarkeit sind die Peptide TESTDIKR und EADYLINKER in blau bzw. rot eingezeichnet. Die beiden möglichen Orientierungen sind für die verschiedenen Ladungszustände der Typ 2 – Produkte angedeutet.

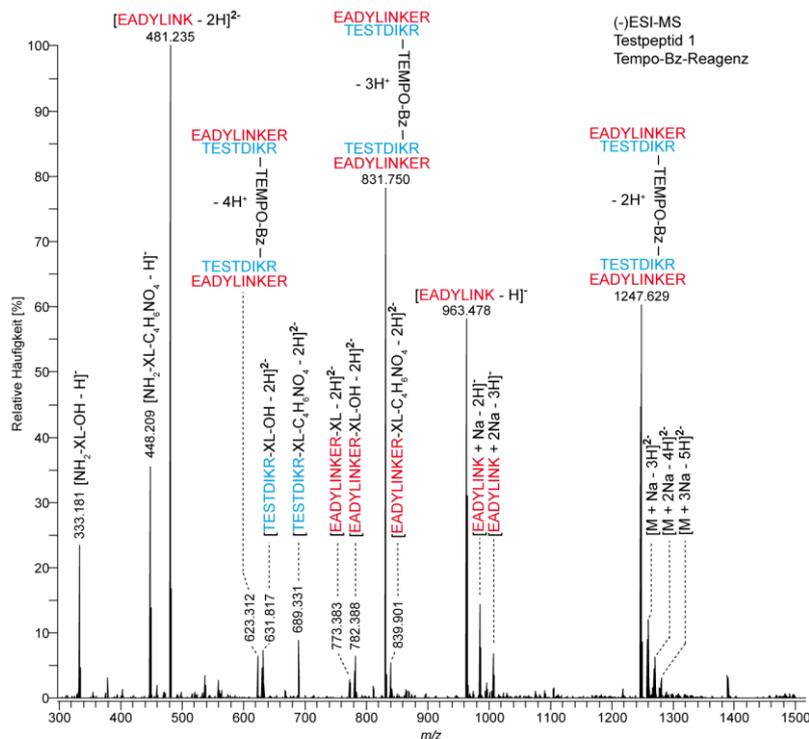


Abbildung 42 Massenspektrum der Quervernetzungsprodukte von Testpeptid 1 mit dem TEMPO-Bz-Linker, mod. nach [254]

Im (-)-ESI-Spektrum treten die Typ 2- Produkte mit drei verschiedenen Ladungszuständen auf: doppelt deprotoniert bei m/z 1247,127 mit gut sichtbaren Natriumaddukten, dreifach deprotoniert bei m/z 831,750 und vierfach deprotoniert bei m/z 623,312 (vgl. Tabelle 18, Anhang). Zudem wurden die einfach modifizierten Produkte von TESTDIKR und EADYLINKER, das freie Peptid EADYLINK, sowohl *Quenching*-Produkte des TEMPO-Bz-Linker gefunden (vgl. Tabelle 19, Anhang). Die Kennzeichnung der Reaktionsprodukte erfolgte durch die Angabe der beiden Modifikationen des Reagenzes: So wird z.B. das einseitig-amidierte und einseitig-hydrolysierte TEMPO-Bz- Linker als „H₂N-XL-OH“ (XL steht für das TEMPO-Bz- Linker) bezeichnet und einfach deprotoniert bei m/z 333,181 gefunden.

Wegen der guten Signalintensität und des erhöhten Ladungszustandes werden im Folgenden die Ergebnisse für die Fragmentierung des dreifach negativ geladenen Typ 2-Reaktionsprodukts (MS/MS) und dessen Fragmenten (MS³) gezeigt. Es wurde für die MS/MS und die MS³- Experimente eine CID-Aktivierung in der Ionenfalle (LIT) durchgeführt und eine

Kollisionsenergie von 35% NCE gewählt. Für die MS³- Experimente wurden die im MS/MS erhaltenen zweifach geladenen Spaltfragmente der TEMPO-Bz-vernetzten Peptide in der Ionenfalle erneut selektiert und anschließend bei 35% NCE einer zweiten Stoßaktivierung unterzogen. Als Massenanalysator wurde für alle Versuche der Orbitrap-Analysator verwendet. In Tabelle 15 sind die theoretischen monoisotopischen Massen der Typ 2-Quervernetzungsprodukte aufgeführt. Darunter sind die theoretischen Werte für die einfach und zweifach deprotonierten, homolytischen Spaltprodukte angegeben.

| R ¹ | R ² | <i>m/z</i> des Molekülions | | | |
|----------------|--|----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | [M – H] ⁺ | [M – 2H] ²⁺ | [M – 3H] ³⁺ | [M – 4H] ⁴⁺ |
| TESTDIKR | EADYLINKER | (2496,261) | 1247,627 | 831,416 | 623,310 |
| EADYLINKER | TESTDIKR | | | | |
| TESTDIKR | [R ¹ -Bz – xH ⁺] ^{x-} | 1064,514 | 531,753 | | |
| | [R ¹ -TEMPO – xH ⁺] ^{x-} | 1129,598 | 564,295 | | |
| EADYLINKER | [R ¹ -Bz – xH ⁺] ^{x-} | 1365,656 | 682,325 | | |
| | [R ¹ -TEMPO – xH ⁺] ^{x-} | 1430,740 | 714,867 | | |

Tabelle 15 *th. m/z-Werte der Typ 2- Produkte von Testpeptid 1 und TEMPO-Bz-Linker*

monoisotopische m/z- Werte der Quervernetzungsprodukte und der homolytischen Spaltprodukte

Anhand des in Abbildung 43 gezeigten Fragmentationenspektrums des dreifach geladenen Vorläuferions ist die bevorzugte homolytische Spaltung des TEMPO-Bz- Linker gut zu erkennen. Es bildete sich bei *m/z* 1365,657 und 1430,742 das jeweils einfach geladene Dublett für das Peptid EADYLINKER und bei *m/z* 531,754 und 564,296 das zu ihm komplementäre, zweifach geladene Dublett für das Peptid TESTDIKR (vgl. Tabelle 20, Anhang). In analoger Weise, aber mit höherer Intensität, wurde das zweifach geladene Dublett für das Peptid EADLINKER (*m/z* 682,326 und 714,868) und das einfach geladene Dublett für das Peptid TESTDIKR (*m/z* 1064,515 und 1129,599) komplementär gebildet. Neben dem prominenten Wasser- und CO₂- Verlust der Spezies „Bz-TESTDIKR“ wurde ein Verlust der Glutamat-Seitenkette „E*“ für die Spezies „Bz-EADYLINKER“ beobachtet. Bei der Spezies „TEMPO-EADYLINKER“ sind neben einem weiteren prominenten Wasserverlust viele weitere schwache Signale zu erkennen, die aus Seitenkettenverlusten oder der Fragmentierung des Peptidrückgrats resultieren.

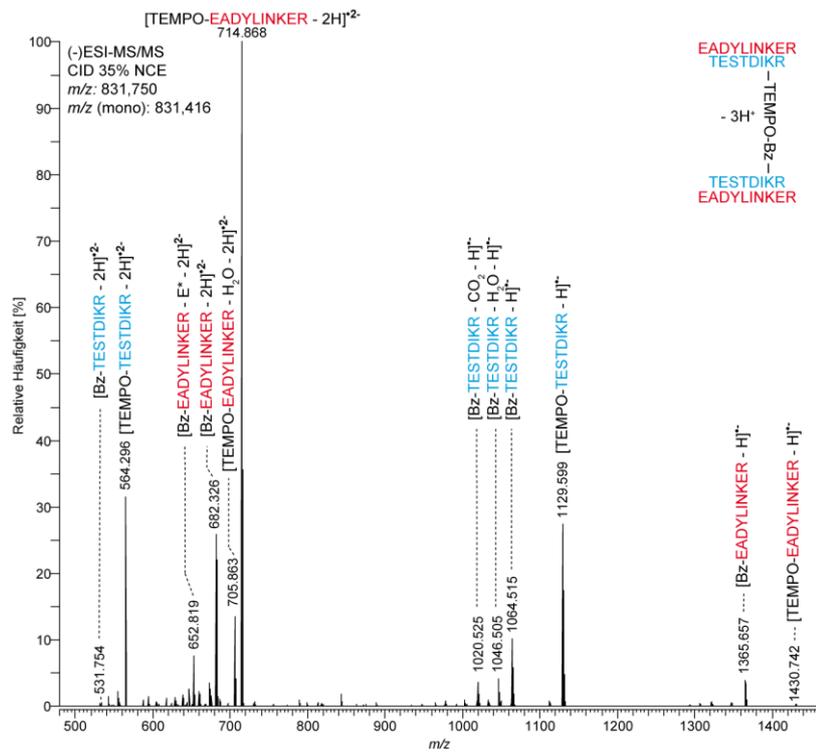


Abbildung 43 CID-MS/MS des dreifach deprotonierten Typ 2- Produkts von Testpeptid 1 bei 35% NCE (m/z 831,750)

Obwohl die Intensitäten dieser Signale niedrig sind, ließ sich anhand einer Verarbeitung des Spektrums mittels der MeroX-Software eine Zuordnung unter guter Sequenzabdeckung erreichen. In Abbildung 44 ist eine automatisch-generierte Zuordnung des Spektrums mittels MeroX gezeigt.

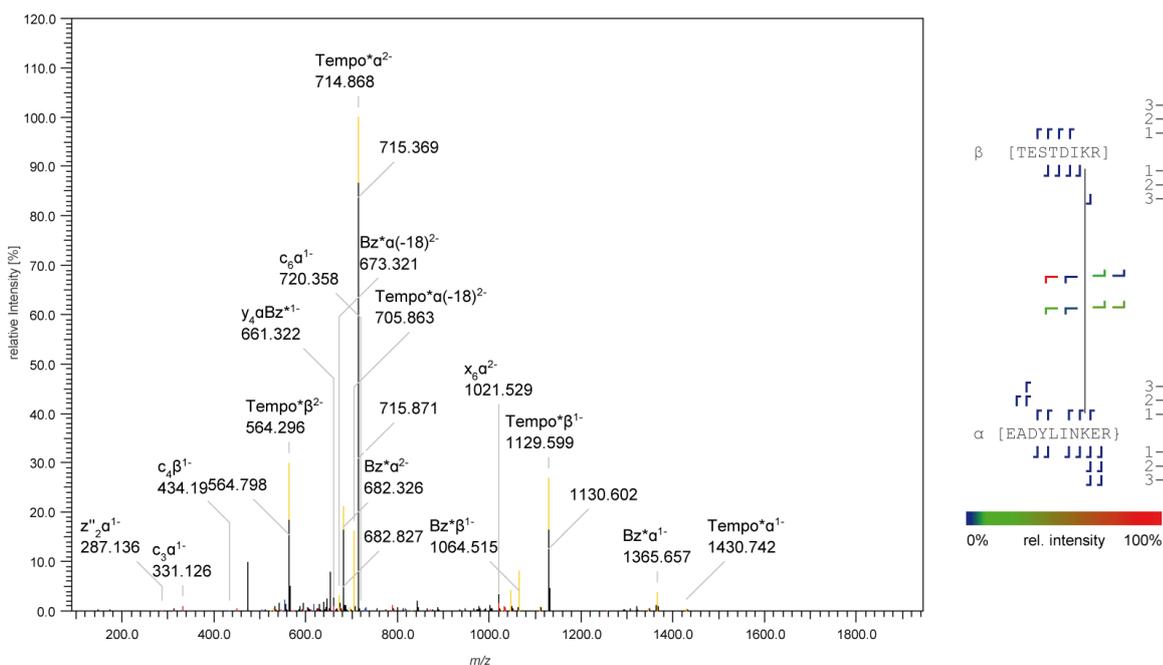


Abbildung 44 Automatisierte Zuordnung der Fragmentationen des dreifach geladenen Typ 2-Produkts von Testpeptid 1 und TEMPO-Bz-Linker, mod. nach [254]

Anhand des Schemas in Abbildung 44 (rechte Seite) wird ersichtlich, dass in beiden Peptidketten Fragmentationen beidseitig der Quervernetzungsstelle gefunden werden. Somit ist eine eindeutige Zuordnung der quervernetzten Aminosäure möglich. Eine nähere Analyse der identifizierten Fragmentationen zeigt, dass vor allem c-, x- und z-Ionen im Rahmen der Fragmentierung entstanden waren. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen für Angiotensin II, bei dessen Untersuchung auch nahezu ausschließlich radikalisch-erzeugte a-, c-, x- und z-Ionen gefunden wurden. Auch hier findet durch die Verwendung von *resonance type*-CID kaum weitere Anregung der erzeugten Fragmentationen statt. So wird die hohe Präferenz der Spaltung des Quervernetzungsreagenz mit anschließender, radikalisch-ausgelöster Fragmentierung der Peptidketten gut ersichtlich. Welchen Anteil die beiden gebildeten Fragmente des Reagenzes an der Gesamtheit der Fragmentierungen haben, wurde durch die Fragmentierung aller vier zweifach geladenen „Bz“- und „TEMPO“- modifizierten Peptide untersucht. Dazu wurden die modifizierten Peptidketten anhand ihres m/z -Wertes innerhalb der LIT selektiert und erneut mittels CID fragmentiert.

6.8 Sequenzielle Fragmentierung der Spaltfragmente des Testpeptids 1

Analog zu den MS/MS- Experimenten wurden die Vorläuferionen mit einer Fensterbreite von 2 Da selektiert und mit 35% NCE fragmentiert. Die selektierten m/z Werte sind Tabelle 15 zu entnehmen. Für eine anschauliche Darstellung werden zunächst die beiden Fragmentationenspektren des Peptids TESTDIKR vorgestellt und gefolgt von den beiden des Peptids EADYLINKER. Im Anschluss werden die gefundenen Fragmente schematisch gegenübergestellt. Es muss beachtet werden, dass durch die erneute Anregung zusätzliche Fragmentierungsereignisse auftreten können, die in einem CID-MS/MS ausbleiben würden. Jedoch findet auch hier nur die Aktivierung des selektierten Vorläuferions statt (*resonance type* CID).

Das in Abbildung 45 gezeigte Fragmentationenspektrum der Spezies [TESTDIKR-Bz – 2H][•]2- weist mehrere bemerkenswerte Regionen auf. Im Bereich von m/z 200 – 400 werden vor allem Fragmentationen vom Typ a₂, c₂, c₃ und z₂ gefunden. Ein sehr schwaches Signal vom Typ a₅ ist bei m/z 504 zu sehen und im m/z -Bereich von 600 bis 900 werden Ionen vom Typ a₆, a₇ bzw. sekundär fragmentierten x₆ und y₇ (weitere Neutralverluste) gefunden. Basispeak des Spektrums ist bei m/z 522 der Wasserverlust des Vorläuferions. Danach folgen bei m/z 482 und 488 prominente Verluste der Argininseitenkette. Ein Verlust der Argininseitenkette mit einhergehendem Verlust des benzoylischen Fragments wurde dem Signal bei m/z 843 zugeordnet.

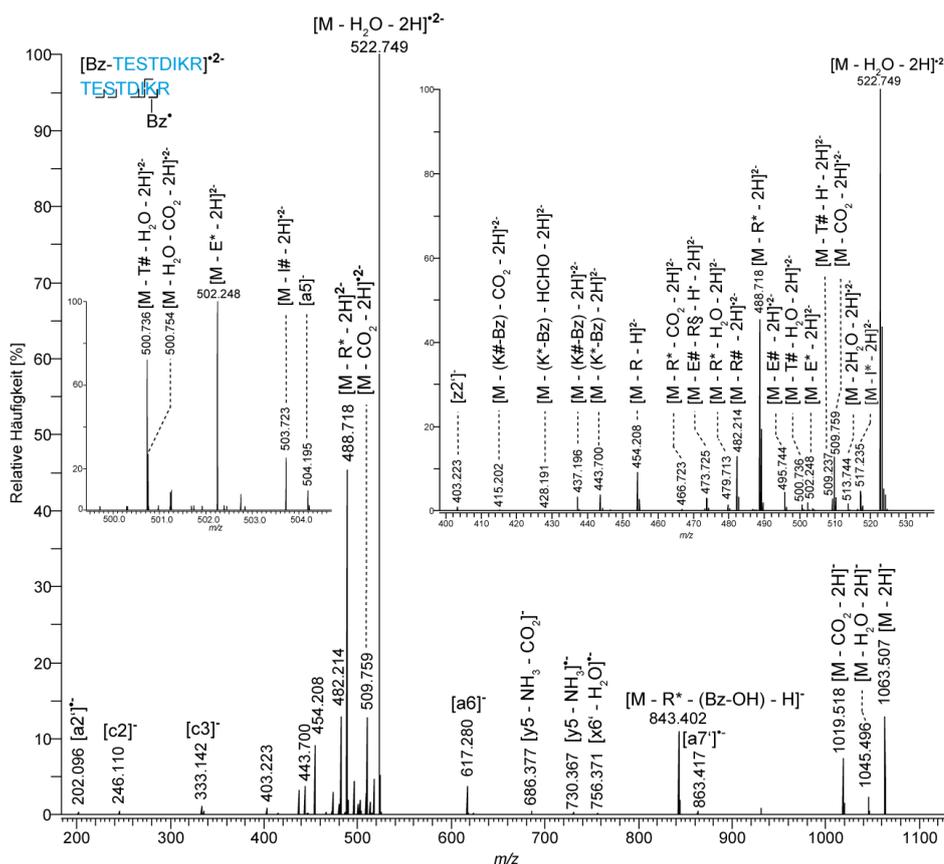


Abbildung 45 CID-MS³ des zweifach geladenen „Bz“-modifizierten Peptids TESTDIKR, (m/z 531,753, 35% NCE) mod. nach [254]

Im Bereich von m/z 400 bis 520 (rechtes eingefügtes Spektrum) dominieren vor allem (Mehrfach-) Verluste am Lysin und Arginin als auch am Glutamat und Threonin (Bereich von 500 – 505 im linken eingefügten Spektrum vergrößert). Bei m/z 517 ist ein für Isoleucin charakteristisches Fragment zu erkennen. Erstaunlich ist der Bereich zwischen m/z 1019 und 1045: Die Reduktion des Ladungszustandes lässt sich nur mit einer (mit dem Neutralverlust gekoppelten) Hydridabgabe erklären – im Falle des Signals bei m/z 1063 sogar ausschließlich durch eine Hydridabgabe. Inwiefern dies durch einen unimolekularen Abgabemechanismus ausgelöst wurde oder auf Interaktionen der Analytmoleküle innerhalb der Ionenfalle zurückgeht, bleibt unklar.

Im Gegensatz dazu zeigte das Fragmentierungsverhalten des TEMPO-modifizierten Peptids, dargestellt in Abbildung 46, vor allem Fragmentionen vom b-, c- und y-Typ. Im Bereich zwischen m/z 200 bis 430 dominieren b₂, c₂, y₆²⁻ und das c₄- Fragment mit mehreren auftretenden Seitenkettenverlusten am Threonin und Serin. Zwischen m/z 590 und 960 sind y₃, y₆, b₇ und y₄- Ion dominierend, wobei das y₄- Ion mehrere Neutralverluste als auch den Verlust eines Methylradikals zeigt. Im m/z -Bereich zwischen 490 und 560 finden sich bis auf eine Ausnahme (sehr schwaches b₅- Ion bei m/z 532) nur radikalische Seitenkettenfragmente. Es ist auffällig, dass neben dem schwachen Verlust von „R§“ bei m/z 543 nur die nicht

radikalischen Seitenkettenverluste des „#“- Typs auftreten - zudem nur aus den alkoholischen Aminosäuren Threonin und Serin, aber in verschiedensten Kombinationen miteinander und gepaart und mit zusätzlichen Verlusten von Methyl- oder Wasserstoffradikalen. Dazu treten häufige Wasserverluste auf. Die drei höchsten Signale sind bei m/z 533, 542 und 555 ebenso durch Wasserverlust und Fragmentierung des Threonins gekennzeichnet. Ein ansonsten nur schlecht erkennbares, aber starkes Signal wird bei m/z 556 beobachtet. Dies entspricht dem Verlust eines Methylradikals, wie man es für die Fragmentierung der TEMPO-Gruppe erwartet.

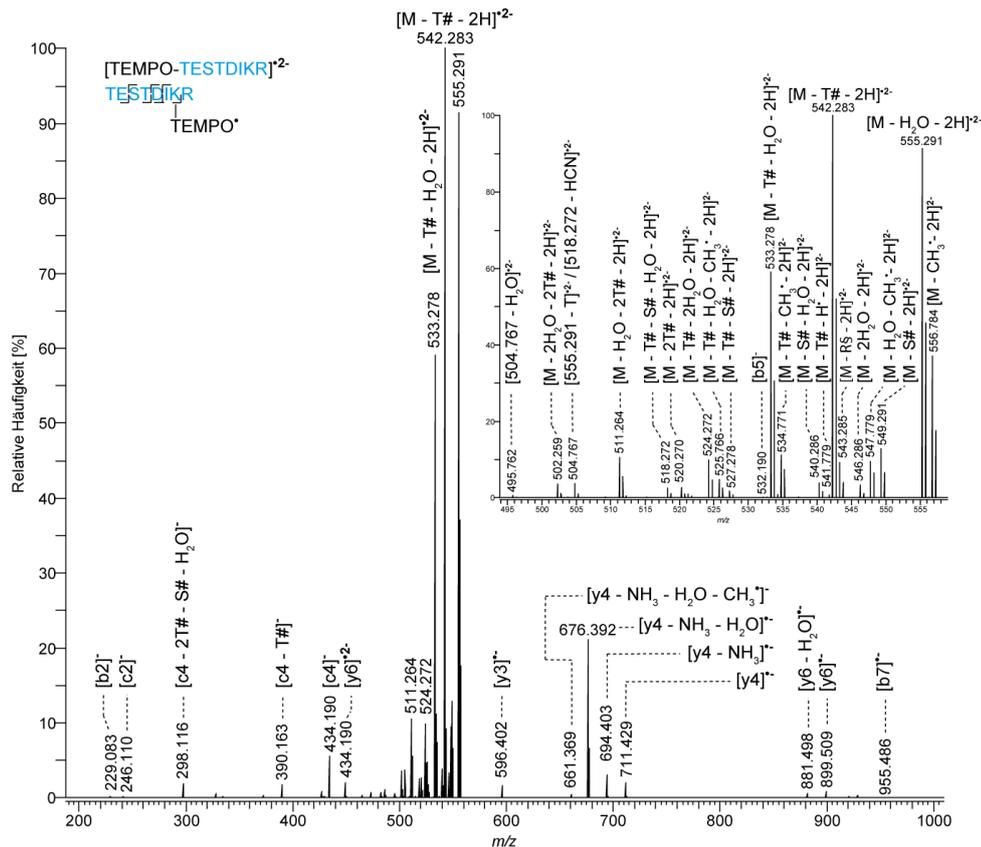


Abbildung 46 CID-MS³ des zweifach geladenen „TEMPO“-modifizierten Peptids TESTDIKR (m/z 564,295, 35% NCE) mod. nach [254]

Demgegenüber zeigt die benzoylische Spezies des Peptids EADLINKER, dargestellt in Abbildung 47, ein dem Spektrum in Abbildung 45 (Bz-TESTDIKR) ähnliches Bild. Über den gesamten m/z - Bereich verteilen sich radikalisch generierte Fragmentationen des Peptidrückrats (c3, a4, a7, z6). Außerdem wird neben einem y7- Ion mit Ammoniakverlust eine Abspaltung des C- terminalen Arginins (m/z 604) beobachtet. Im m/z - Bereich zwischen 580 und 680 dominieren Seitenkettenfragmentierungen fast aller Aminosäuren (E, Y, K, R, N, L, I), welche häufig mit CO₂- oder Wasserverlust einhergehen. Der sehr intensive Basispeak bei m/z 652 kann durch einen Seitenkettenverlust der Glutaminsäure vom Typ „E*“ erklärt werden. Das zweithöchste Signal bei m/z 643 resultiert aus einem darauffolgenden Wasserverlust und das dritthöchste Signal bei m/z 673 aus einem Wasserverlust des selektierten Vorläuferions. Von besonderem Nutzen sind die Seitenkettenfragmente des Leucins und Isoleucins, die bei

m/z 654, 660 und 667 gefunden werden. Die durch ihre Nähe zum Basispeak sehr klein wirkenden Signale, weisen dennoch eine gute Signalintensität auf. Durch die Massenanalyse im Orbitrap Massenanalysator kann bei m/z 660,779 zweifelsfrei ein Verlust vom Typ „L*“ gefunden werden (angrenzendes Signal bei 660,319). Durch das Signal bei m/z 654 konnte zwar auf das Vorkommen von Leucin bzw. Isoleucin in der Aminosäuresequenz geschlossen werden, aber anhand des Signals bei m/z 660 in Verbindung mit dem Signal bei m/z 667 (Verlust von „I*“) kann geschlussfolgert werden, dass sowohl Leucin, als auch Isoleucin im Peptid enthalten sind. Obwohl die Reihenfolge der beiden isobaren Aminosäuren nicht abgeleitet werden kann, ist dieser Machbarkeitsnachweis von großer Bedeutung.

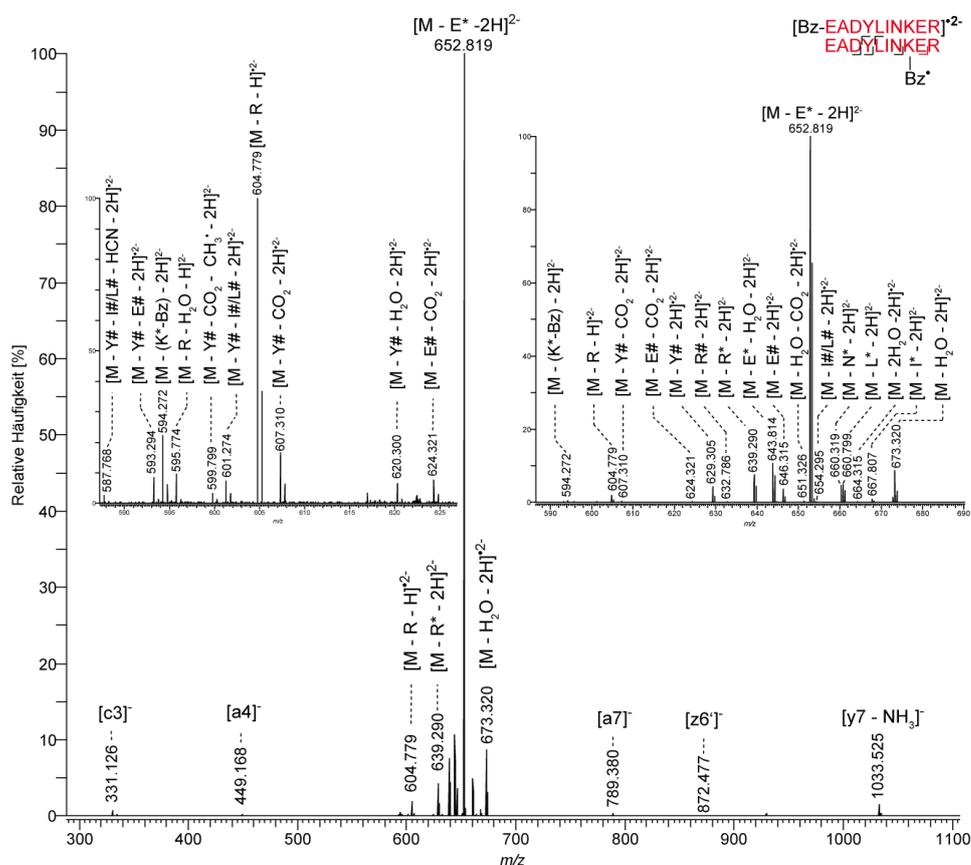


Abbildung 47 CID-MS³ des zweifach geladenen „Bz“-modifizierten Peptids EADYLINKER (m/z 682,325, 35% NCE) mod. nach [254]

In ähnlicher Weise wie das TEMPO-modifizierte Peptid TESTDIKR, zeigt auch das in Abbildung 48 dargestellte, TEMPO-modifizierte Peptid EADYLINKER eine verstärkte Fragmentierung des Peptidrückrats und vielfältige Wasserverluste. Über den gesamten Massenbereich verteilt sind neben wenigen Ionen vom c- Typ (c2, c7, c6, c9), vor allem Ionen des y- Typ (y2, y3, y8, y9²⁻, y7, y9) bzw. des b- Typ vorzufinden (b7, b8, b9). Für die Ionen vom Typ c7 und c9 wurde eine Masse bestimmt, die einer deamidierten Spezies entsprechen würde. Diese Ionen sind nicht eindeutig für die Identifizierung geeignet, da der Mechanismus ihrer Entstehung, trotz konsistenter Fragmentierung, im Unklaren blieb. Die zwei höchsten

Signale entsprechen dem selektierten Vorläuferion nach einmaligem und zweimaligem Wasserverlust. Die zwei Signale nächst-höherer Intensität entsprechen dem einfach und zweifach geladenen y_8 - Ion nach Wasser- und Ammoniakverlust. Eine bevorzugte Fragmentierung bei y_7 kann in diesem Zusammenhang durch die Asparaginsäure in Position 3 erklärt werden. Im m/z - Bereich zwischen 560 und 700 sind zudem Seitenkettenverluste des Arginins vom Typ „R*“ und „R ξ “ sowie einige für die TEMPO- Gruppe erwartete Abspaltungen von Methylradikalen identifiziert wurden (m/z 698 und 689).

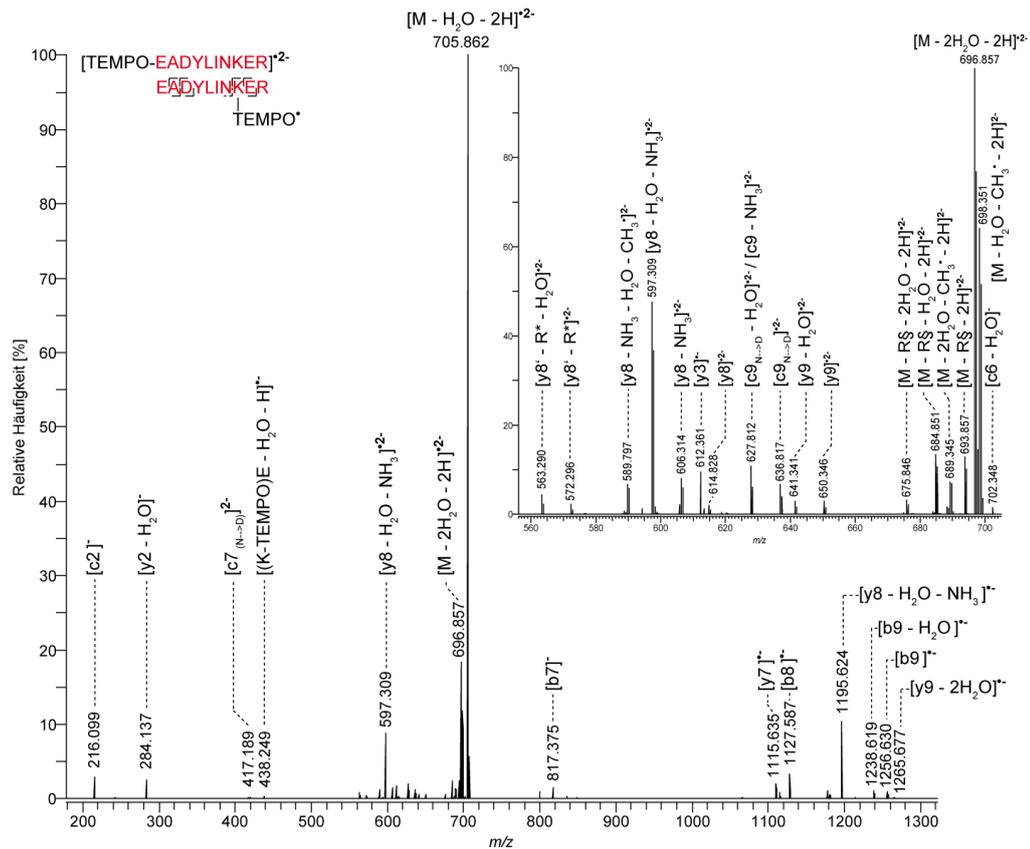


Abbildung 48 CID-MS³ des zweifach geladenen „TEMPO“-modifizierten Peptids EADYLINKER (m/z 714,867, 35% NCE) mod. nach [254]

Stellt man die Fragmentierungen der beiden Peptide mit jeweils beiden Modifikationen schematisch dar (Abbildung 72 A und B), so fallen folgende, auf die Modifikationen zurückzuführende, Ähnlichkeiten auf:

Die TEMPO- modifizierten Fragmente zeigen im MS³ wenige Seitenkettenfragmente und häufige Wasserverluste. Es wird des Öfteren der Verlust eines Methylradikals beobachtet, was (neben anderen möglichen Ursprüngen) mit der Fragmentierung der TEMPO-Gruppe erklärt werden kann (siehe Abbildung 37 A). Für das Peptid TESTDIKR wurden nur für Serin und Threonin Seitenkettenfragmente vom Typ „S#“ und „T#“ gefunden. Zusätzlich wurde der Formamidin- /Carbodiimid- artige Seitenkettenverlust des Arginins vom Typ „ ξ R“ gefunden. Für das Peptid EADYLINKER wurden ausschließlich Seitenkettenfragmente für Arginin

gefunden, wobei erneut der Typ „R§“ dominierte und nur ein schwaches Signal für „R*“ gefunden wurde. Es wurde zudem für beide Peptide eine gute Fragmentierung des Peptidrückrats gefunden, welche vor allem von den komplementären Ionen des b- und y- Typs dominiert wird und zusätzliche Ionen vom c- Typ aufweist.

Im Gegensatz dazu, zeigen die Bz- modifizierte Fragmentionen im MS³ eine viel ausgeprägtere Fragmentierung der Seitenketten. Vor allem Glutaminsäure liefert für beide Peptide sowohl das Seitenkettenfragment „E#“ als auch „E*“, wobei für das Peptid EADYLINKER der Verlust von „E*“ das Spektrum dominiert. Zugleich sind Seitenkettenverluste am Arginin vom Typ „R*“ für beide Peptide stark ausgeprägt. Im Gegensatz zu den TEMPO- modifizierten Fragmenten wird eine Seitenkettenfragmentierung des modifizierten Lysins und vermehrte CO₂- Abspaltung beobachtet. Obwohl die CO₂- Abspaltung nicht eindeutig zugeordnet werden kann, scheint ihr Fehlen für die TEMPO- modifizierten Spezies auf eine durch das Bz-Radikal verursachte Fragmentierung zurückzugehen. Ein radikalischer Abbau der Asparaginsäure könnte dies erklären. Insbesondere die vollständige Seitenkettenfragmentierung des Isoleucins beim Peptid TESTDIKR bzw. des Isoleucins und des Leucins beim Peptid EADYLINKER, zeigen den Nutzen der radikalisch- ausgelösten Seitenkettenfragmentierung durch die „Bz“- Modifikation an. Die Fragmentierung des Peptidrückrats erfolgt vor allem durch die Bildung von komplementären Ionen des a- und x- Typs, sowie des c- und z- Typs. Damit ist eine komplementäre Fragmentierung, sowohl im Hinblick auf die Seitenkettenfragmentierung als auch die Fragmentierung des Peptidrückrats gegeben (Abbildung 72, Anhang).

7 Quervernetzung mit BrPU

7.1 Zielstellung

Eine vereinfachte Identifizierung von Quervernetzungsprodukten mittels Isotopenmarkierung erfolgt zumeist durch die Verwendung einer Mischung von deuterierten und undeuterierten Reagenzien. Dabei bilden sich um die Massendifferenz der Markierung verschobene Paare der Reaktionsprodukte, welche gezielt einer Fragmentierung zugeführt werden. Die Identifizierung von Quervernetzungsprodukten könnte jedoch auch anhand eines, durch das Reagenz eingeführten, ungewöhnlichen Massendefekts erfolgen. Der BrPU- Linker vereint diese beiden Ansätze und kombiniert diese mit der bekannten Spaltbarkeit einer zentralen Harnstoffgruppe. Die Fragmentierungseigenschaften und die Eignung für die Identifizierung der Quervernetzungsprodukte wurden getestet.

7.2 Auswahl der Modellpeptide und Reaktionsbedingungen

Zunächst wurden die drei Tripeptide EAA, DAA und VVA der Untersuchung zugeführt. Im Anschluss wurden humanes Angiotensin II und Testpeptid 1 (verbunden mit tryptischer Proteolyse) untersucht. Da BrPU eine sehr schlechte Wasserlöslichkeit aufweist, wurde nach Vorversuchen auf eine Reaktionsführung in DMSO übergegangen. Die in DMSO gelösten Peptide wurden mit einer DMSO-Lösung des Reagenzes versetzt und nach erfolgter Reaktion und Quenching stark mit Wasser verdünnt. Im Falle des Testpeptid 1 schloss sich eine tryptische Proteolyse an. Nach einer Entsalzung der Reaktionsmischungen mittels *C₁₈-ZipTip* wurden die erhaltenen, angereicherten Fraktionen mit Triethylamin versetzt und mit (-)-ESI analysiert.

7.3 Erwartetes Fragmentierungsverhalten und Nomenklatur der Fragmente

Durch die zentrale Harnstoffspaltstelle des BrPUs kann eine kollisionsinduzierte Fragmentierung des Reagenzes in ein Isocyanat- und ein Amin-Fragment erfolgen. Auf jedes der gebildeten Fragmente geht eines der beiden Brom-Atome mit der natürlichen Häufigkeit von ~50% ⁷⁹Br und ⁸¹Br über (Abbildung 49). Zwischen dem einfach bromierten Isocyanat-Fragment (BrIC) und dem einfach bromierten Amin-Fragment (BrAm) entsteht daher die für Harnstoffspaltstellen typische Massendifferenz von 25,979 u (Abbildung 50).

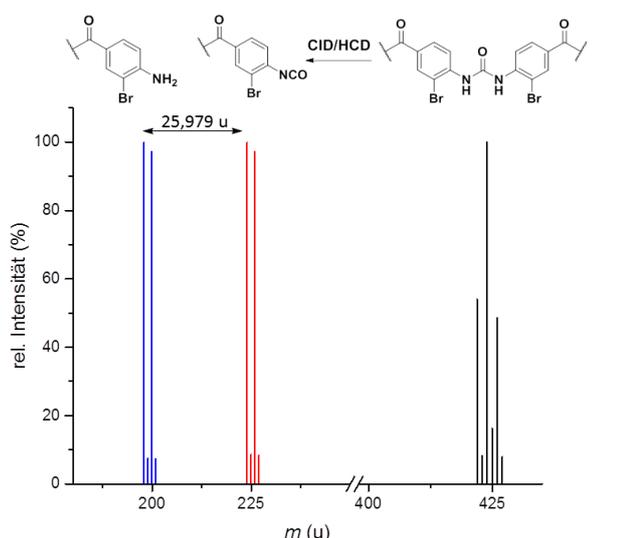


Abbildung 49 Isotopenmuster der Massenmodifikation durch BrPU und dessen Fragmente

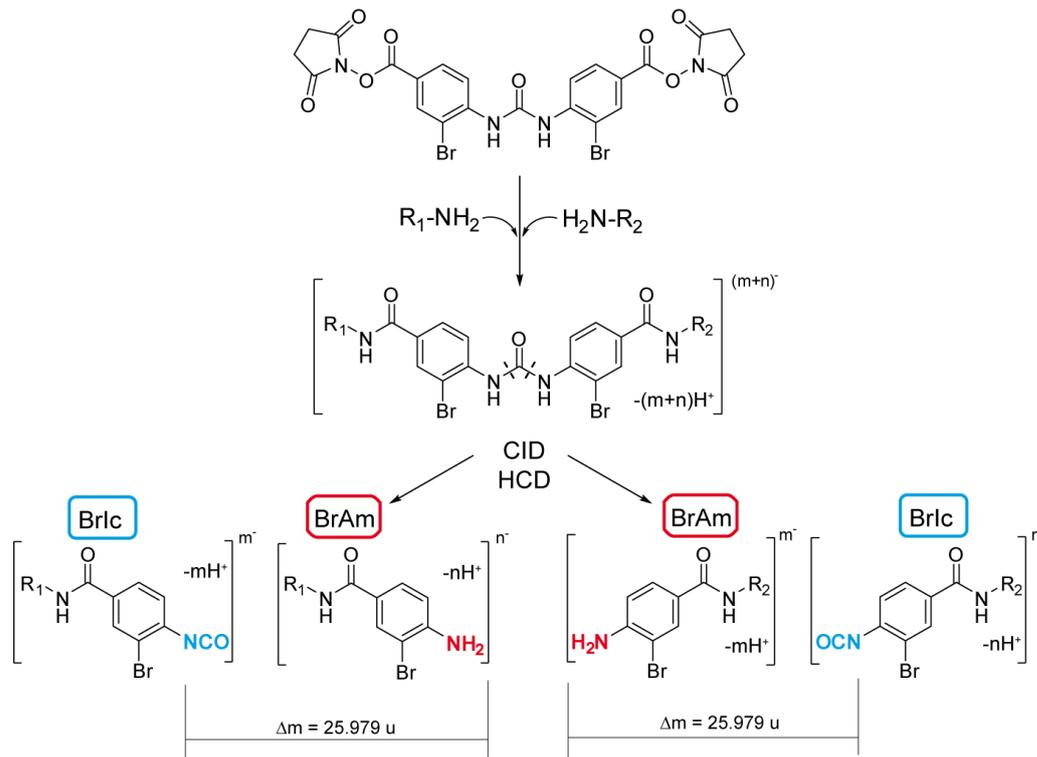


Abbildung 50 Fragmentierung von BrPU im (-)-ESI, mod. nach [253]

Die Spaltfragmente zeigen die für Brom typische ~1:1 Isotopenverteilung mit einer Massendifferenz von ~2 u, während das intakte Reagenz nahezu eine 1:2:1 Verteilung zeigt. Die intakte Modifikation mit BrPU hat die Zusammensetzung $C_{15}H_8Br_2N_2O_3$. Bei einer exakten Masse von 421,89017 u weist sie einen Massendefekt von ~108,3 mu auf. Die Massenmodifikation durch das BrAm-Fragment hat die Zusammensetzung C_7H_5BrNO und weist mit einer exakten Masse von 197,95545 u einen Massendefekt von ~44,6 mu auf. Die Modifikation durch das Isocyanat-Fragment BrIc hat die Zusammensetzung $C_8H_2BrNO_2$, eine exakte Masse von 223,93472 u und einen Massendefekt von ~65,3 mu.

7.4 Testung der Fragmentierung an Modellpeptiden mittels CID und HCD

Die Fragmentierung wurde zunächst an den drei Modellpeptiden EAA, DAA und VVA mittels CID und HCD erprobt. Es wurden jeweils das zweifach negativ geladene Vorläuferion isoliert und mittels 15% NCE fragmentiert. Um die Ko-Isolierung von Gasphasenaddukten auszuschließen, wurde für alle drei Fälle eine Aktivierung in der Ionenquelle durchgeführt (*in-source activation*). Dazu wurde ein Potential von 30–60 Volt eingestellt, so dass der Ionenstrom gerade noch hoch genug war, um MS/MS-Daten aufzunehmen.

Am Beispiel des Peptids EAA ist sehr gut zu erkennen, dass das Vorläuferion das erwartete Isotopenmuster mit einer ~ 1:2:1- Verteilung aufweist (Abbildung 51, oberes Inlay). Bei der Fragmentierung mittels CID werden hingegen nur sehr wenig fragmentierter Quervernetzer und

keine Fragmentationen des Peptids beobachtet. Das Isotopenmuster ist bei beiden Fragmenten zum leichteren Isotop hin verschoben (Abbildung 51, unten).

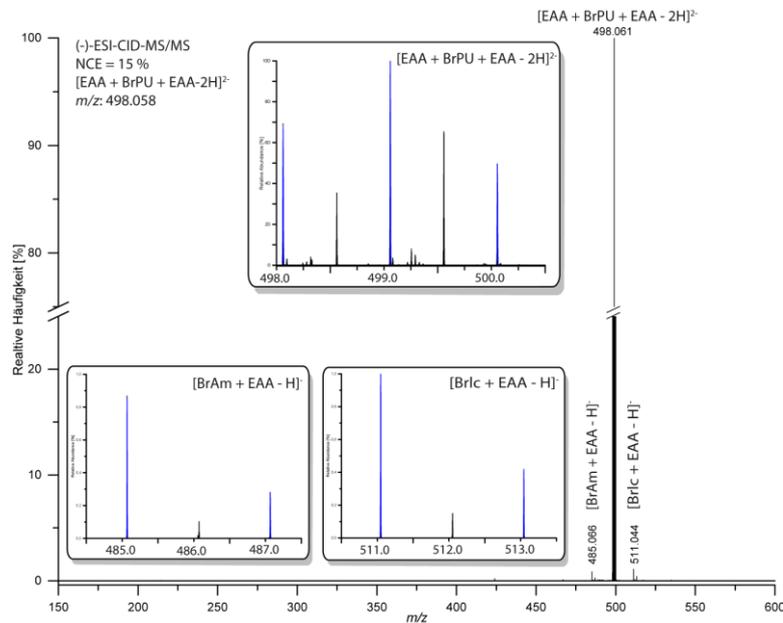


Abbildung 51 CID-MS/MS des Typ 2-Produkts von EAA, mod. nach [253]

Bei der Fragmentierung mit 15% NCE unter HCD-Bedingungen ist dies weniger stark ausgeprägt und es zeigen sich zusätzliche Neutralverluste neben b- und y-Ionen (Abbildung 52).

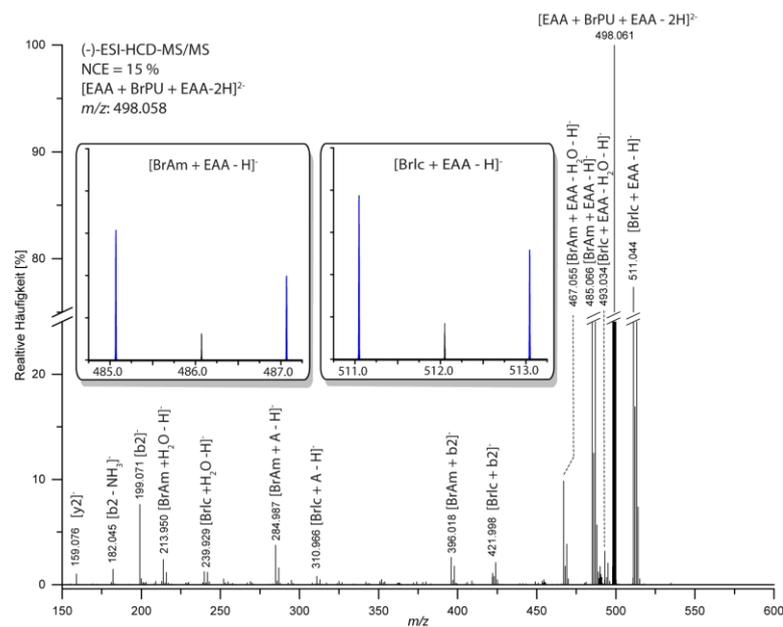


Abbildung 52 HCD-MS/MS des Typ 2-Produkts von EAA, mod. nach [253]

Für die mit BrPU-Fragmenten modifizierten Ionen sind die Dubletts im Spektrum zu erkennen, wobei auch hier der monoisotopische ^{79}Br -Peak eine erhöhte Intensität aufweist. Im HCD-MS/MS sind zudem weitere, sehr schwache Signale über den ganzen m/z -Bereich zu erkennen.

Diese konnten nicht zugeordnet werden und könnten aus sekundären Fragmentierungsreaktionen entstehen, die durch die breite Aktivierung aller Ionen im HCD möglich sind.

Ein ähnliches Ergebnis bezüglich der Fragmentierungseffizienz wird auch für das Modellpeptid DAA erhalten. Im CID-MS/MS (Abbildung 53) werden vor allem die mit den BrPU-Fragmenten modifizierten intakten Peptidketten und einige Wasserverluste des Vorläuferions und BrAm-Fragments beobachtet. Unerwartet ist hingegen die Abspaltung der formal-hydrolysierten Linker-Fragmente, was erneut auf ein besonderes Fragmentierungsverhalten der N-terminal modifizierten Asparaginsäure hindeuten könnte.

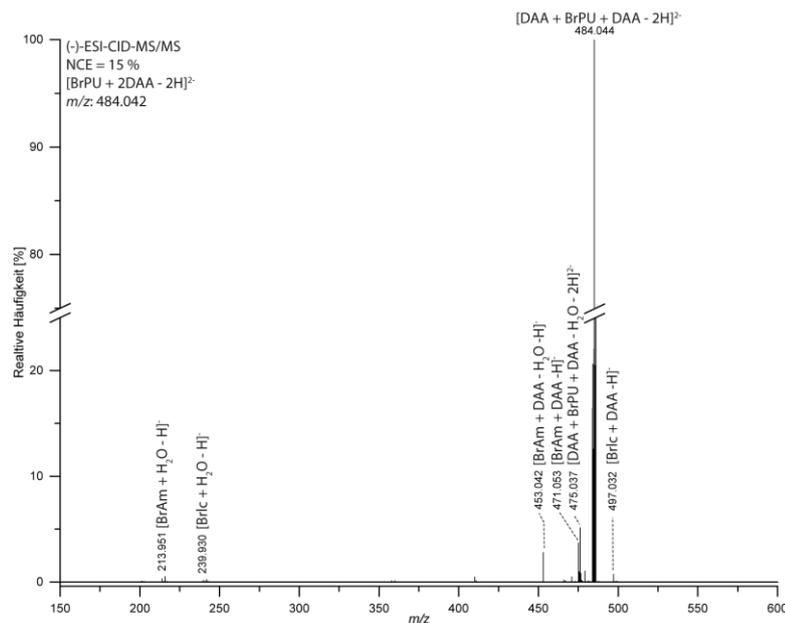


Abbildung 53 CID-MS/MS des Typ 2-Produkts von DAA, mod. nach [253]

Im Gegensatz dazu, wird im HCD-MS/MS (Abbildung 54) eine viel stärkere Fragmentierung des Vorläuferions beobachtet. Dies äußert sich insbesondere in den bedeutend höheren Intensitäten der Linker-Fragmentierung. Weiterhin werden vielfältige Wasserverluste gefunden und eine sehr prominente Fragmentierung an der N-terminal verknüpften Asparaginsäure beobachtet. Dabei ist der detektierte Peptidkettenverlust bei m/z 239 keine intakte Peptidkette, sondern weist einen Wasser- und einen Ammoniakverlust auf. Neben einem y_2 - Ion werden zudem die mit einem a_1 -Ion der Peptidkette modifizierten Linkerfragmente gefunden und auch hier ein formal -hydrolysiertes BrAm- Fragment. Zudem treten Signale auf, die nicht zugeordnet werden können. Erneut zeigt sich im Falle eines N-terminal quervernetzten Aspartats ein unerwartetes Fragmentierungsverhalten.

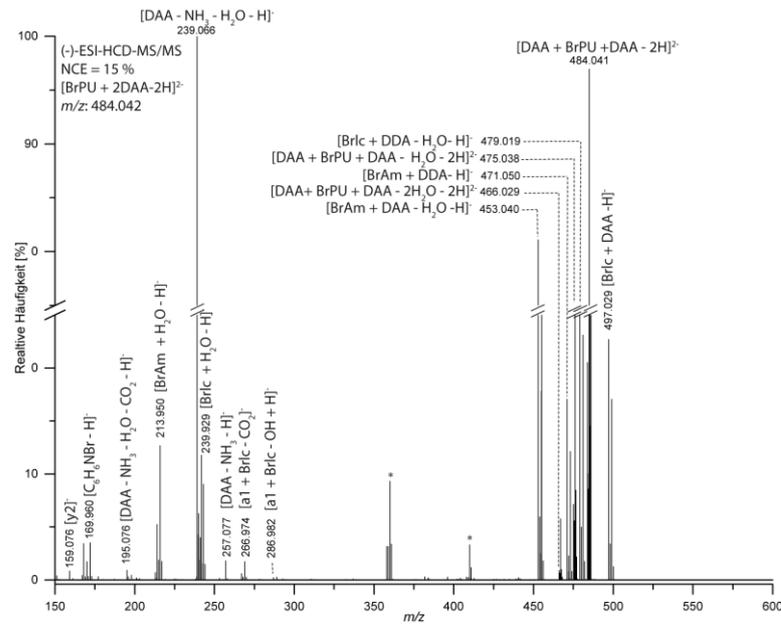


Abbildung 54 HCD-MS/MS des Typ 2-Produkts von DAA, mod. nach [253]

In den CID-MS/MS-Experimentendes Tripeptids VVA (Abbildung 55) dominiert auch die Fragmentierung des Linkers und es sind formal-hydrolysierte Linkerfragmente zu erkennen. Da bei VVA mit einer *in-source activation* von 60 V gearbeitet wurde, um die Neigung zur Bildung von Gasphasenaddukten zu unterdrücken, war hier die Intensität des Vorläuferions im MS nur noch schwach. Zudem wurde im MS eindeutig eine zweite Spezies bei betreffendem m/z -Wert beobachtet, die im Rahmen der *in-source activation* bedeutend schwächer fragmentiert wird als das eigentliche Quervernetzungsprodukt. Die nicht annotierten Signale stammen wahrscheinlich von dieser Spezies.

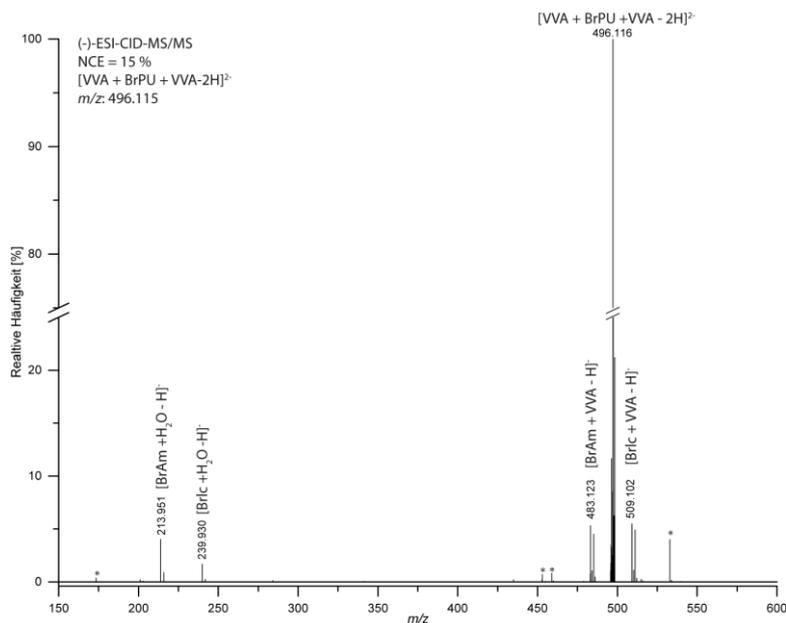


Abbildung 55 CID-MS/MS des Typ 2-Produkts von VVA, mod. nach [253]

Im HCD-MS/MS von VVA (Abbildung 56) zeigt sich neben einer vergleichsweise schwachen Fragmentierung des Linkers in die BrIc- und BrAm-modifizierten Peptide eine verstärkte Bildung nicht zugeordneter Fragmente, die aus der koinzidenten Spezies stammen könnten. Neben dem b2-modifizierten BrIc-Fragment wird das ungewöhnliche c1-modifizierte BrAm-Fragment gefunden. Zudem sind ein unmodifiziertes b2-Ion mit erfolgtem Ammoniakverlust und Linkerfragmente, die formal nur ein Ammoniak tragen, zu sehen. Dies spricht für eine ungewöhnliche Fragmentierung am N-terminalen Valin. Die Überlagerung mit der koinzidenten Spezies und die hohe benötigte Aktivierung in der Quellenregion, um Gasphasenaddukte zu vermeiden, lassen das Modellpeptid VVA als ungeeignet für eine schlüssige Analyse der Fragmentierung des BrPU-Linkers erscheinen.

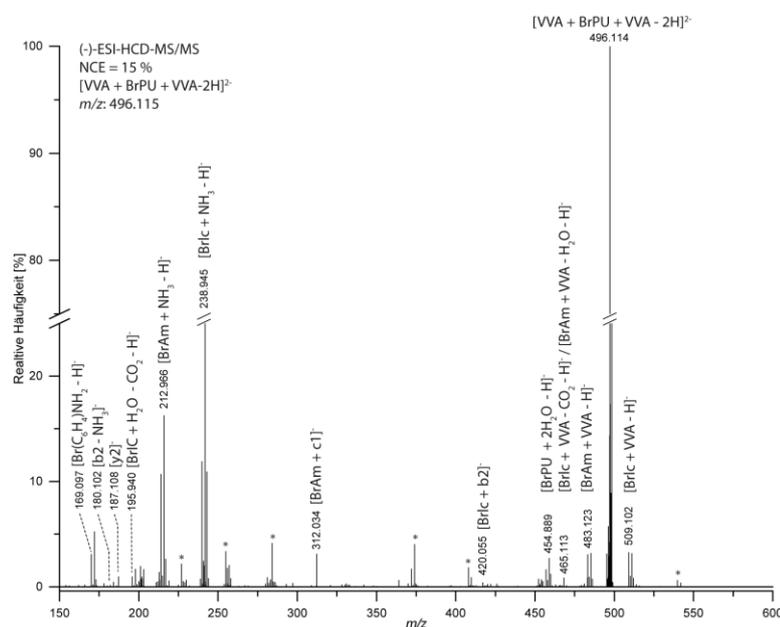


Abbildung 56 HCD-MS/MS des Typ 2-Produkts von VVA, mod. nach [253]

Neben den drei Tripeptiden wurden Angiotensin II und Testpeptid 1 in ihrem Fragmentierungsverhalten untersucht.

Im Fall des CID-MS/MS von Angiotensin II (Abbildung 57) wird eine gute Fragmentierung der Br-PU-Linkers beobachtet. Die Signale beider Fragmente sind bei einer Kollisionsenergie von 20% NCE intensiver als das verbleibende Signal des Vorläuferions. Neben einem γ 7-Ion des Angiotensins wird zudem ein starkes Signal für den Verlust einer gesamten Peptidkette gefunden. Die Peptidkette ist nicht intakt, sondern weist sowohl einen Wasser-, als auch einen Ammoniakverlust auf, wie es auch für das Tripeptid DAA beobachtet wurde. Zudem werden Peptidketten mit doppeltem und einfachem Wasserverlust, einem Ammoniakverlust sowie einem Verlust an Guanidin gefunden. Überraschend ist das Auffinden von Spezies, die formal einem Verlust eines hydrolysierten Linkerfragments aus dem intakten Typ 2-Produkt

entsprechen. Das prominente Auftreten des Peptidverlusts im Zusammenhang mit diesen Fragmenten deutet auf eine komplexe Umlagerung im Rahmen der Fragmentierung hin.

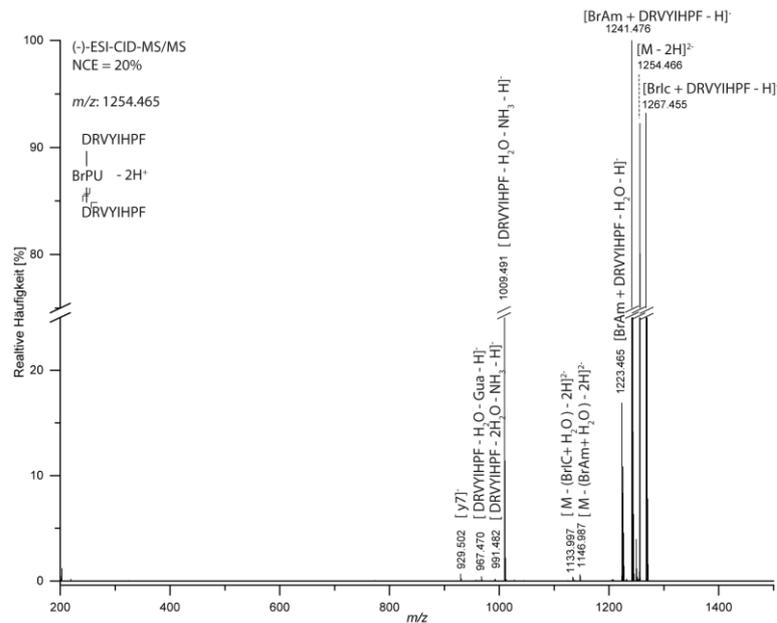


Abbildung 57 CID-MS/MS des Typ 2-Produkts von Angiotensin II, mod. nach [253]

Ein ähnliches Bild ergibt sich aus den HCD-MS/MS-Experimenten des Angiotensin II (Abbildung 58). Es ist ersichtlich, dass vor allem die Intensität des $\gamma 7$ -Ions vergrößert und die Fragmentierung des Vorläuferions vollständiger ist. Zudem zeigt sich zusätzlich zum dem im CID beobachteten BrIc-Fragment mit Wasserverlust das BrAm-Fragment mit Wasserverlust. Auch wird bei m/z 1027 ein zusätzliches Peptidfragment gefunden, welches einer intakten Peptidkette mit Ammoniakverlust entspricht.

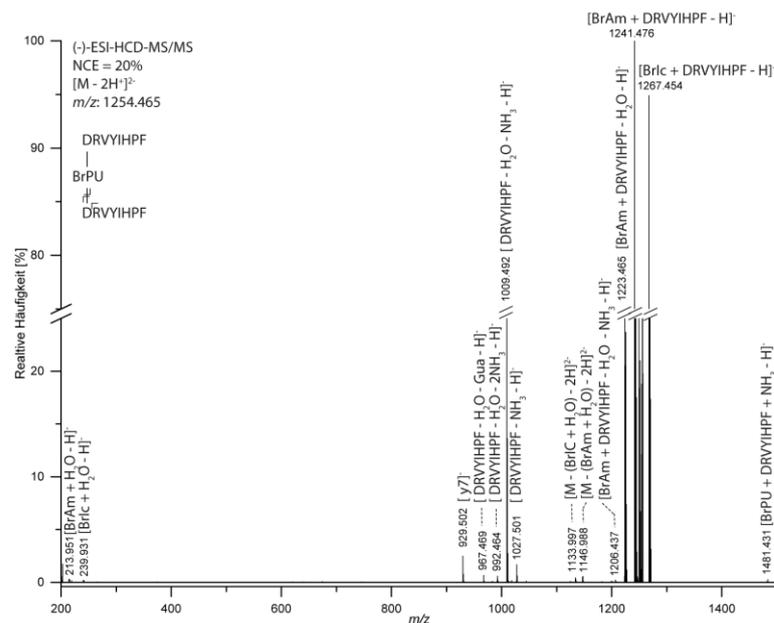


Abbildung 58 HCD-MS/MS des Typ 2- Produkts von Angiotensin II, mod. nach [253]

Bei m/z 213 bzw. 239 werden die formal hydrolysierten BrIc- und BrAm- Fragmente gefunden, was durch die bessere Ionentransmission kleiner Fragmentionen innerhalb der HCD-Zelle begründet sein könnte. Interessant ist ein zusätzlich auftretendes Signal bei m/z 1481, welches einem intakten Linker, der sowohl mit einer Peptidkette als auch einem Ammoniak modifiziert ist, entspricht. Der Verlust vom Precursor, der genau zu diesem Fragment führen würde, entspricht genau dem bei m/z 1027 gefundenen intakten Peptid mit Ammoniakverlust.

Unter beiden Fragmentierungsbedingungen wird nahezu keine Sequenzinformation (bis auf das y_7 -Ion) erhalten. Vielmehr tritt fast ausschließlich eine Abspaltung der nahezu intakten Peptidketten auf. Besonders im Fall des HCD-MS/MS tritt zudem ein komplementäres Ionenpaar auf, welches auf eine ungewöhnliche Fragmentierung an der quervernetzten N-terminalen Aminogruppe der Asparaginsäure hindeutet.

Zuletzt wurde das Fragmentierungsverhalten des dreifach-deprotonierten quervernetzten Testpeptids 1 untersucht. Im Rahmen der tryptischen Proteolyse sind in diesem Fall die beiden Peptidketten TESTDIKR und EADYLINKER durch die ϵ -Amine der Lysine vernetzt. Im CID-Produktionsmassenspektrum des Quervernetzungsprodukts von Testpeptid 1 (Abbildung 59) sind nahezu ausschließlich die komplementären einfach und zweifach geladenen Fragmente nach der Spaltung des Linkers zu beobachten. Ein intaktes Vorläuferion kann bei 20% NCE nicht mehr beobachtet werden. Für die BrAm- Fragmente von TESTDIKR und EADYLINKER wurden zudem Wasserverluste beobachtet. Vollkommen überraschend ist die scheinbare Koisolation eines zweifach geladenen, einseitig hydrolysierten Reaktionsprodukts mit dem Peptid EADYLINKER.

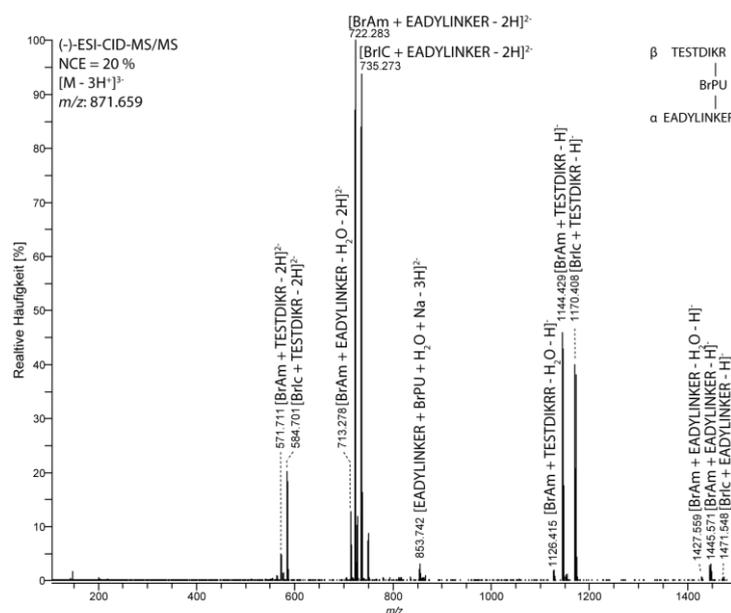


Abbildung 59 CID-MS/MS des Typ 2- Produkts von Testpeptid 1, mod. nach [253]

Dieses liegt zudem nicht frei, sondern als Natriumaddukt vor. Da der m/z -Wert dieser Spezies mit 853 hinreichend weit genug vom selektierten m/z -Wert von 871 entfernt liegt, kann dafür keine Erklärung gefunden werden. Dennoch konnte die Identität durch die hochgenaue Masse und auch durch das doppelt bromierte Isotopenmuster bestätigt werden. Trotz guter Fragmentierung des Linkers können den CID-MS/MS-Experimenten leider keine Sequenzinformationen über die quervernetzten Peptide entnommen werden.

Im Gegensatz dazu ermöglicht die Fragmentierung des Quervernetzungsprodukts mittels HCD (Abbildung 60) die Ableitung einiger Sequenzinformationen.

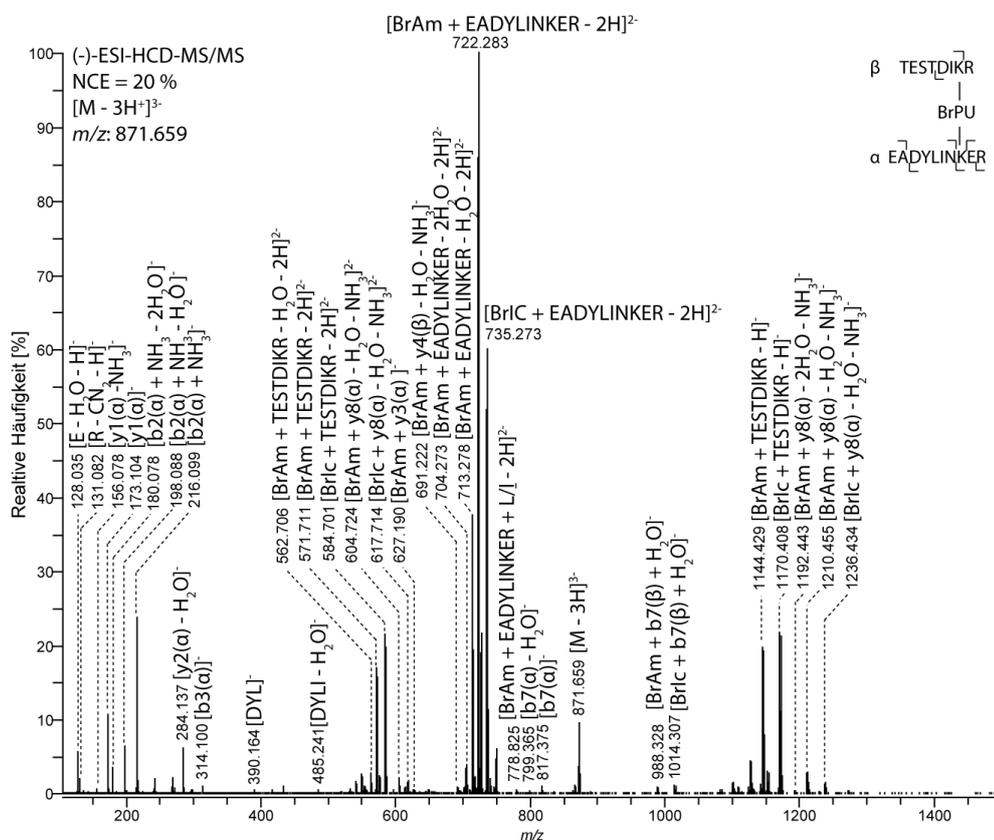


Abbildung 60 HCD-MS/MS des Typ 2- Produkts von Testpeptid 1, mod. nach [253]

Es zeigen sich erneut einfach und zweifach geladen Fragmenten der BrIc- und BrAm-modifizierten Peptide. Im Gegensatz zum CID-MS/MS wurden jedoch keine einfach geladenen Fragmente des Peptids EADYLINKER gefunden. Überraschenderweise ist im Gegensatz zum CID-MS/MS noch ein Signal des unfragmentierten Vorläuferions erhalten. Zudem zeigen sich erneut vielfältige Wasserverluste der Fragmenten der modifizierten Peptide. Hervorzuheben ist die sehr starke Fragmentierung des α -Peptids EADYLINKER. Es werden y_1 -, y_2 -, b_2 -, b_3 - und b_7 -Ionen mit Neutralverlusten gefunden, sowie die komplementären mit Linkerfragmenten modifizierten y_3 - und y_8 -Ionen. Für das β -Peptid TESTDIKR werden modifizierte y_4 - und b_7 -Ionen gefunden. Zudem werden einige interne Fragmente des α -Peptids bei m/z 390 bzw. 485

gefunden. Es fällt auf, dass sehr viele Fragmentationen weitere Neutralverluste von Wasser und oder Ammoniak aufweisen.

7.5 Isotopenmuster der Vorläuferionen

Eine weitere Fragestellung bei der Untersuchung des Br-PU-Linkers umfasste die Eignung einer Identifizierung von Quervernetzungsprodukten anhand des Massendefekts und des Isotopenmusters, welches durch die Bromierung hervorgerufen wird. Wie in Abbildung 49 und Abbildung 51 gezeigt wurde, weisen sowohl die Vorläuferionen als auch die Fragmentationen des BrPU-Linkers die charakteristischen Isotopenmuster auf, welche theoretisch zu erwarten sind. Während das charakteristische Isotopenmuster der gebildeten Linkerfragmente mit einer Massendifferenz von ~ 2 u zur Identifizierung von modifizierten Fragmentationen innerhalb des MS/MS genutzt werden kann, besteht weiterhin die Frage, inwiefern sich der Massendefekt bzw. das Isotopenmuster des Vorläuferions zu einer Identifizierung von Quervernetzungsprodukten anhand des MS nutzen lässt. Um diese Fragestellung zu klären, wurden exemplarisch mittels eines abgewandelten Averagine-Modells, welches Schwefel außer Acht lässt, die Isotopenmuster für hypothetische Verbindungen mit einer Masse von $\sim 1,5$ kDa, ~ 3 kDa und ~ 6 kDa bis zu einer relativen Intensität von 5% simuliert. Dabei werden zunächst doppelt bromierte Spezies unbromierten Spezies (unmodifizierten Peptiden) vergleichbarer Masse gegenübergestellt.

Im Fall der $\sim 1,5$ kDa schweren Spezies (Abbildung 61) zeigt sich zunächst noch das gut erkennbare 1:2:1 Isotopenmuster (Abbildung 61, oben), welches durch die zwei Bromatome hervorgerufen wird.

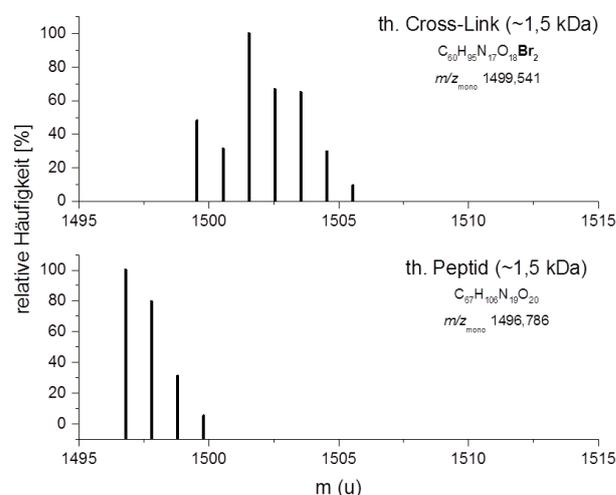


Abbildung 61 Simulierte Isotopenmuster einer doppelt bromierten Spezies und eines unbromierten Peptids mit $\sim 1,5$ kDa

Gleichzeitig ist die Verbreiterung des Isotopenmusters von vier Signalen im Fall des hypothetischen unmodifizierten Peptids auf sieben Signale im Fall der doppelt bromierten Spezies gut erkennbar.

Das vorhergesagte Isotopenmuster deckt sich dabei sehr gut mit dem Isotopenmuster des ca. 1 kDa schweren Typ 2- Quervernetzungsprodukts des Tripeptids EAA mit BrPU (Abbildung 62). Dennoch wird schon in diesem einfachen Fall klar, dass eine Diskriminierung nur anhand der Massendifferenz von ~ 4 u zwischen der Spezies, die zwei ^{79}Br und der, die zwei ^{81}Br enthält, nicht möglich ist.

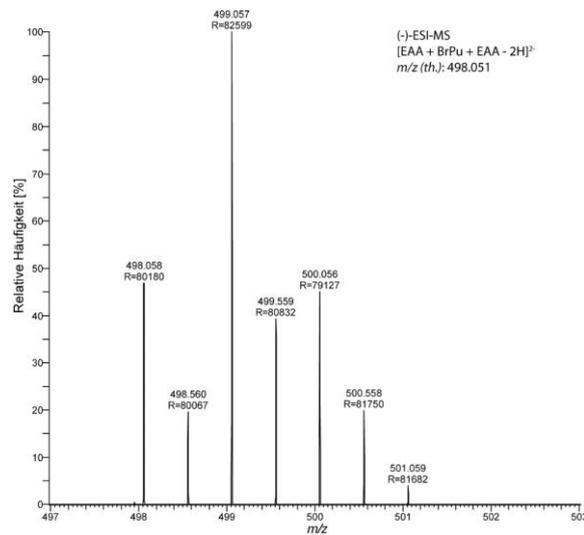


Abbildung 62 Isotopenmuster des Typ 2-Quervernetzungsprodukts von EAA

Die Überlagerung mit der gemischten Spezies (ein ^{79}Br und ein ^{81}Br) führt zu einer so breiten Isotopenverteilung, dass im Gegensatz zur ^4D -Markierung keine zwei voneinander getrennten Populationen entstehen. Eine automatisierte Selektion des Quervernetzungsprodukts durch das Massenspektrometer anhand eines (vorgegebenen) *Leicht/Schwer*-Isotopenmusters, wie es für isotopenmarkierte Cross-Linker (z.B. im Falle einer vierfachen Deuterierung) noch bedingt möglich wäre, ist daher schon für kleine Peptide in Verbindung mit Br-PU-Linker nicht praktikabel.

Beim Übergang zu größeren Massen von ~ 3 kDa (Abbildung 63) verbreitert sich die Isotopenverteilung eines hypothetischen Peptids auf fünf Signale, wobei der ^{13}C -Peak bereits die höchste Intensität der Verteilung aufweist. Demgegenüber verbreitert sich die Isotopenverteilung einer doppelt bromierten Spezies schon auf neun Signale und es ist kein eindeutiges 1:2:1 Isotopenmuster mehr erkennbar.

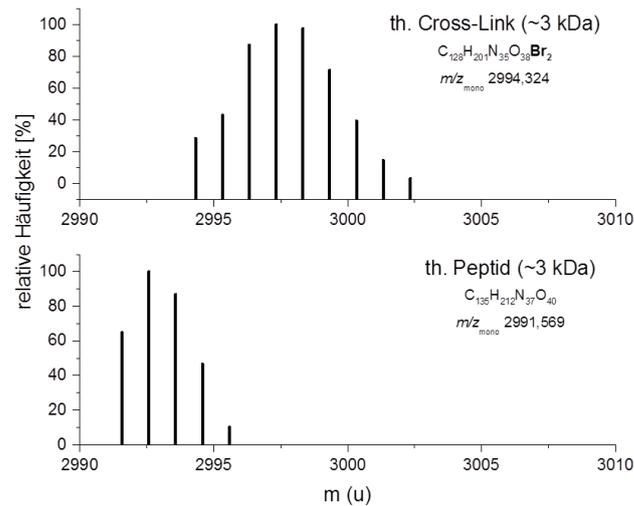


Abbildung 63 Simulierte Isotopenmuster einer doppelt bromierten Spezies und eines unbromierten Peptids mit ~ 3 kDa

Durch die Überlagerung des Isotopenmusters der zwei Bromatome mit dem natürlich-verbreiterten Isotopenmuster des vergrößerten Peptids wird also die Breite der gesamten Isotopenverteilung von fünf auf neun Signale nahezu verdoppelt.

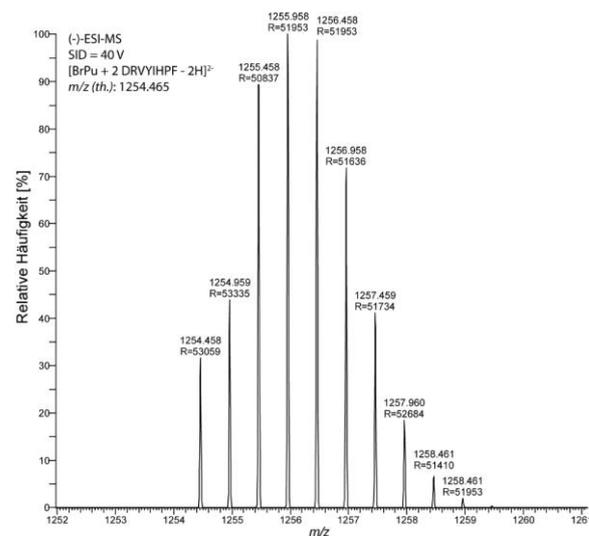


Abbildung 64 Isotopenmuster des Typ 2- Quervernetzungsprodukts von Angiotensin II

Dies hat zudem die Konsequenz, dass die Signalintensität des Analyten auf nahezu doppelt so viele Signale verteilt wird, wodurch die absolute Intensität der einzelnen Signale reduziert, und eine Detektion prinzipiell erschwert wird. Dabei deckt sich die simulierte Isotopenverteilung (Abbildung 63, oben) sehr gut mit dem Typ 2- Quervernetzungsprodukt von Angiotensin II mit BrPU, welches eine Masse von ~ 2,5 kDa aufweist (Abbildung 64).

Eine weitere Verdopplung der Masse auf hypothetische ~ 6 kDa würde im Fall eines unmodifizierten Peptids (Abbildung 65, unten) eine ähnlich geformte Isotopenverteilung aufweisen, wie das quervernetzte Produkt des Angiotensin II (Abbildung 64), jedoch anstatt neun nur sieben Signale zeigen und wäre somit noch immer bedeutend schmalere verteilt.

Demgegenüber würde eine zweifach bromierte Spezies mit ~ 6 kDa (Abbildung 65, oben) schon zehn Isotopensignale (im Gegensatz zu sieben für das Peptid) aufweisen und außer der ungewöhnlich verbreiterten Isotopensignatur, ist durch die doppelte Bromierung kein für eine automatisierte Auswertung nutzbares, charakteristisches Isotopenmuster mehr sichtbar.

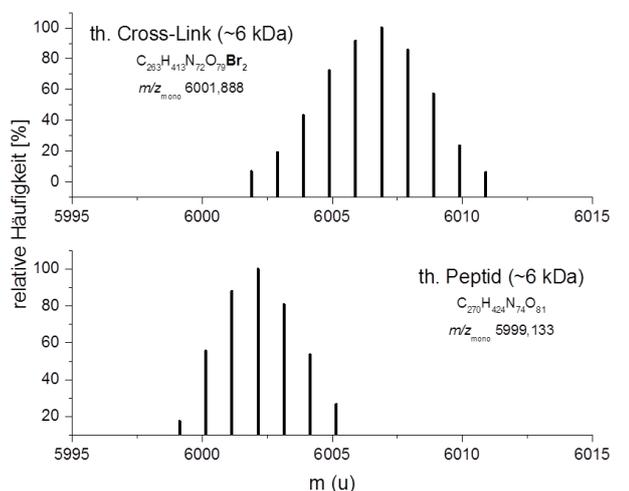


Abbildung 65 Simulierte Isotopenmuster einer doppelt bromierten Spezies und eines unbromierten Peptids mit ~ 6 kDa

8 Quervernetzung mit IDDI

8.1 Zielstellung

Die bisher vorgestellten Harnstoff-basierten MS-spaltbaren Quervernetzungsreagenzien können nur an den Amidfunktionen der Harnstoffgruppe oder einem, bzw. beiden Spacer(n) modifiziert werden. Es ist zu erwarten, dass eine Derivatisierung der Amide der Harnstoffgruppe zum Verlust der für Harnstoff typischen Spaltbarkeit führt, da keine Isocyanat-Fragmente mehr gebildet werden können (vgl. Abbildung 16). Im Fall der aktivierten Kohlensäurederivate (CDP, CDI, CDT, DSC) ist keine Derivatisierung durchführbar, da keine primären Amidgruppen zur Verfügung stehen. Es wurde daher eine „verdoppelte“ Harnstoff-Funktion- eine Biuret-basierte Spaltstelle- hinsichtlich ihrer massenspektrometrischen Spaltbarkeit untersucht. Ziel war die Synthese eines Imidazolid-basierten Quervernetzungsreagenzes auf Basis der Imidodicarbonsäure. Anhand der Quervernetzung von Modellpeptiden sollte die MS-Spaltbarkeit und das Fragmentierungsverhalten der durch Quervernetzung gebildeten Biuret-Gruppe untersucht werden. Zudem wurde versucht, N-alkylierte Derivate dieses Quervernetzungsreagenzes zu erhalten.

8.2 Konzeption des Reagenzes und Synthese von Imidodicarbonsäurediimidazol

Durch Selbstkondensation unter Ammoniakabgabe kann aus Harnstoff Biuret erzeugt werden. Das zugrundeliegende, instabile N,N-Diimid der Kohlensäure ist die Imidodicarbonsäure, welche im freien Zustand spontan decarboxyliert. Daher ist Biuret nur über drei Wege zugänglich: Einerseits kann durch Addition der instabilen Isocyanensäure, also durch Carbamoylierung, an eine Harnstoffgruppe ein Biuret erzeugt werden. Im Rahmen der Carbamoylierung entsteht jedoch eine nicht aktivierte terminale Amidgruppe, welche zur Quervernetzungsreaktion nicht befähigt ist. Eine zweite Variante der Synthese besteht in der Erzeugung von Chlorcarbonylisocyanaten, welche durch doppelte Addition geeigneter Nucleophile, wie z.B. zwei Aminen, zu den betreffenden Biuretverbindungen reagieren können. Durch die Verwendung von Chlorcarbonylisocyanat können jedoch nur zentral unsubstituierte Biuret-Verbindungen erzeugt werden. Des Weiteren war Chlorcarbonylisocyanat zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit nicht (mehr) kommerziell erhältlich. Als dritte Variante wäre die Verwendung von Dichlorimidodicarbonsäure, welche aus Chlorcarbonylisocyanat durch Addition von Chlorwasserstoff gewonnen werden kann. Auch wenn N-substituierte Chlorimidodicarbonsäuren aus Aminen und Phosgen unter drastischen Bedingungen (Autoklav, hohe Temperaturen) zugänglich sind, wurde aufgrund der hohen Toxizität von gasförmigem Phosgen von dessen Verwendung abgesehen.

Da, wie in Kapitel 3.5.1 dargestellt, Carbonylimidazole den Chlorcarbonylen vergleichbare Reaktivitäten aufweisen [226], wurde versucht, die Biuret-artigen Verbindungen mittels Carbonyldiimidazol anstatt Phosgen aus den betreffenden Aminen zu gewinnen. Durch Reaktion des Amins mit Carbonyldiimidazol kann in einem ersten Schritt ein isolierbares Carbonylimidazolid des gewünschten Amins erhalten werden [228]. Durch erneute Addition einer Carbonylimidazolid-Einheit mittels CDI wären N-substituierte Diimidazole der Imidodicarbonsäure theoretisch zugänglich. Da jedoch keine N-substituierten Derivate durch Umsatz mit CDI erhalten werden konnten, beziehen sich die nachfolgenden Ausführungen nur auf das N-unsubstituierte Reagenz und erfolgter Reaktion mit zwei Aminogruppen.

Zur Synthese von Imidodicarbonsäurediimidazol wird vom Carbamoylimidazol ausgegangen, welches aus Imidazoliumhydrochlorid und Kaliumisocyanat zugänglich ist. Das entstehende schwerlösliche Carbamoylimidazol ist in vielen organischen Lösungsmitteln nahezu unlöslich. Eine weitere Umsetzung mit CDI zum gewünschten Quervernetzungsreagenz wurde nur in siedendem Pyridin und heißem N, N'-Dimethylethylenurea (DMEU) beobachtet. Obwohl die Reaktionszeiten sehr lang waren, konnte das erhaltene Rohprodukt sehr gut in kaltem Pyridin aufgenommen und mittels THF gefällt werden, sodass eine einfache Möglichkeit zur Reinigung

des hygroskopischen Produkts besteht. Aufgrund der schlechten Löslichkeit wurden weder eine säulenchromatographische Reinigung des erhaltenen Produkts durchgeführt, noch NMR-Spektren aufgenommen. Verunreinigungen mit Carbamoylimidazol und Imidazol wären mittels ^1H oder ^{13}C -NMR nur schwer von den Signalen der Verbindung zu unterscheiden. Das Produkt wurde daher nur mittels nESI-MS/MS auf Identität überprüft und direkt für die Versuche an den vier Modellpeptiden verwendet.

In ähnlicher Weise wie CDI zeigt IDDI ein besonderes Verhalten in Bezug auf die Bildung von Typ 0- Quervernetzungsprodukten. Findet eine einseitige Hydrolyse des Reagenzes statt, zerfällt die entstehende freie Imidocarbonsäure durch Decarboxylierung zum Carbamoylimidazolid (Abbildung 73 A, links). Da dieses schwer löslich ist und nicht weiter hydrolysiert wird (vgl. wässrige Synthese), besitzt es keine störende Reaktivität und sollte nicht weiter hydrolysieren (bei Zerfall Bildung von Ammoniak, Kohlendioxid und Imidazol). Hat jedoch eine einseitige Reaktion mit einem geeigneten Nukleophil des Proteins/Peptids stattgefunden (Abbildung 73 A, rechts), führt eine nachgelagerte Hydrolyse des reaktiven Intermediats über Decarboxylierung zu einer verbleibenden Carbamoylierung an der betreffenden Aminosäure (Abbildung 73 B, links). Nur erneute Reaktion mit einem geeigneten Nukleophil führt zu Quervernetzungsprodukten vom Typ 2 (Abbildung 73 B, rechts).

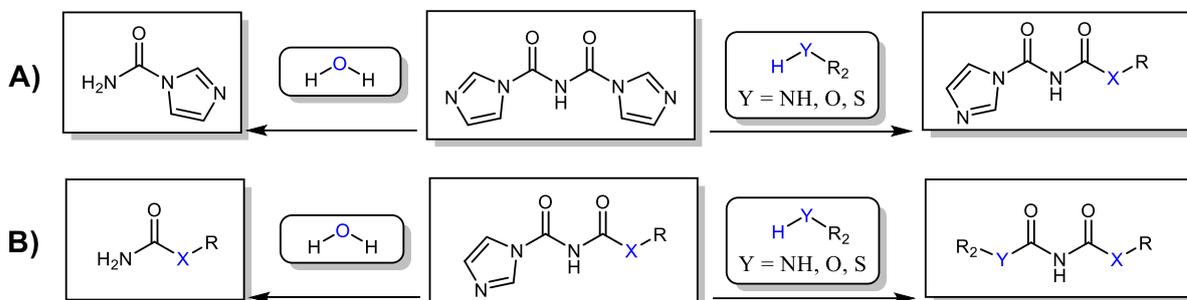


Abbildung 66 Reaktivitäten von IDDI mit verschiedenen Nukleophilen

A) Bildung von Carbamoylimidazol mit H₂O (links) oder des reaktiven Intermediats (rechts)

B) Hydrolyse des Intermediats zur carbamoylierten Aminosäure (links) oder Bildung des Typ 2-Cross-Links durch erneute Reaktion mit geeignetem Nukleophil (rechts)

Durch fehlende Substitution des zentralen Stickstoffatoms der Imidgruppe entsteht bei Quervernetzung durch Reaktion mit zwei Amingruppen eine zentrale Gruppe, die vier harnstoffartige Amidbindungen aufweist. Der zuvor dargestellten massenspektrometrischen Spaltung von Harnstoffen folgend, können daher vier komplementäre Paare der Spaltprodukte entstehen (siehe Abbildung 67, oben).

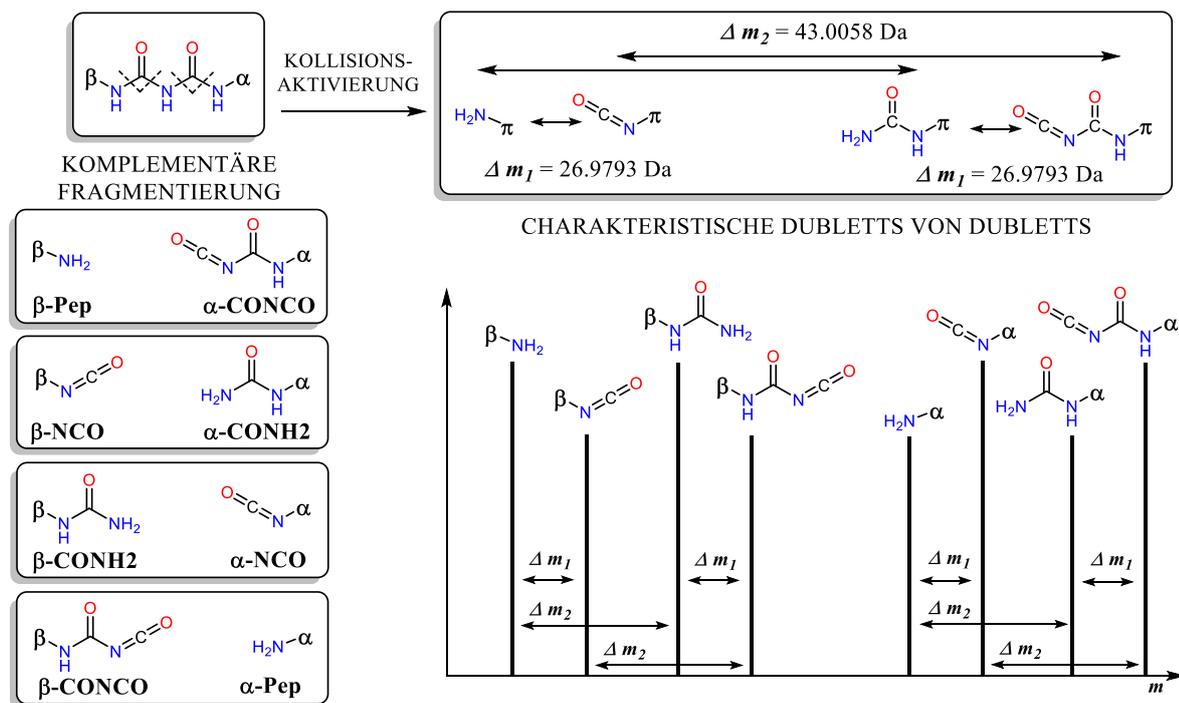


Abbildung 67 Harnstoffartige Spaltung der Biuret-Gruppe nach Quervernetzung

Jede quervernetzte Aminogruppe kann daher mit vier verschiedenen Massenmodifikationen auftreten. Dabei weisen jeweils die zwei leichteren und die zwei schweren Fragmente eine für die Harnstoffspaltung typische Massendifferenz von 26.9793 Da auf. Zudem zeigen die Fragmente des schweren Paares gegenüber dem leichten Paar eine genau um 43.0058 Da vergrößerte Masse. Stöchiometrisch unterscheiden sich die Paare also genau durch die Addition der Summenformel HNCO. Zur Unterscheidung der Fragmente wurden diese innerhalb der MeroX-Software als „Pep“, „NCO“, „CONH2“ und „CONCO“ benannt und werden der Bezeichnung der Peptidkette (α - oder β -Peptid) angehängt. Die vier komplementären Spaltprodukte sind in Abbildung 67 links dargestellt, das entstehende charakteristische Dublett der Dubletts für beide Peptidketten rechts.

8.3 Automatisierte Auswertung der MS/MS-Spektren für Modellpeptide

Um das Fragmentierungsverhalten des IDDI-Reagenzes zu bestätigen und dessen Eignung zur automatisierten Auswertung der erhaltenen Fragmentationenspektren zu demonstrieren, wurden vier Modellpeptide mittels IDDI quervernetzt und untersucht. Es wurden dazu die Peptide Angiotensin II, MRFA, Substanz P und Thymopentin mit 10-fachem molarem Überschuss IDDI-Linker für 20 Minuten bei Raumtemperatur in HEPES-Puffer (pH 7,5) quervernetzt. Nach Entsalzung der Proben mittels C_{18} -ZipTIPS wurden die Proben offline an einem Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer analysiert (nESI, Kapillarspannung 1,1 kV, Quelltemperatur 275°, HCD-MS/MS, 20%NCE, Isolationsfenster 2 Th, Orbitrap

9 Diskussion

9.1 N, N' -Carbonyldiimidazol

Mit der Anwendung von CDI zur Quervernetzung von Proteinen wurde das kürzeste denkbare Quervernetzungsreagenz zur Erzeugung von MS-spaltbaren Quervernetzungsprodukten vorgestellt und erfolgreich auf mehrere Proteinsysteme angewendet. Obwohl CDI und die ihm verwandten Reagenzien seit nunmehr 60 Jahren bekannt sind, baute diese Arbeit auf die besonderen Eigenschaften von CDI auf und stellte diese heraus. Die breite Verfügbarkeit und die kostengünstige Beschaffung von CDI seien zudem hervorgehoben. Die Untersuchung von CDI und seiner Analoga offenbarte, dass gerade CDI die richtige Balance zwischen Reaktivität und Hydrolysestabilität aufweist. Während CDP sich als vollkommen unreaktiv erwies und DSC nur geringe Reaktivität zeigte, muss davon ausgegangen werden, dass im Gegensatz dazu CDT bereits so reaktiv ist, dass nahezu sofortige Hydrolyse beim Kontakt mit Wasser eintritt, bzw. die gebildeten intermediären Azolide zu instabil sind, um Quervernetzungsprodukte zu bilden. Jedoch weist CDI zwei Mängel auf: Zum einen benötigt es eine Reaktionstemperatur von mindestens 10°C und ist daher für manche Cross-Linking-Protokolle (Cross-Linking auf Eis) ungeeignet. Zum anderen reagiert es sehr schnell, so dass CDI nicht für Quervernetzungsreaktionen an Zellen verwendet werden kann. Eine Permeation der Zellmembran innerhalb der kurzen Halbwertszeit des CDI in Wasser scheint ausgeschlossen. Denkbar ist, dass zur Durchführung solcher Experimente hohe Konzentrationen und lange Inkubationszeiten mit DSC zielführender sind. Wiederum ist das hohe Maß an Reaktivität von CDI auch ein Vorteil, da schnelle Quervernetzungsreaktionen eine höhere Aussagekraft über den (induzierten) Zustand eines Systems besitzen und prinzipiell weniger Artefakte bilden sollten. Hinzu kommen die von CDI erzeugten, sehr kurzen Quervernetzungen, die mit Blick auf stringente Abstandsinformationen unübertroffen sind, liegt die überbrückte Distanz zwischen den vernetzten Aminen (bzw. Hydroxylen) doch im Bereich der Länge einer Disulfidbrücke. Herauszustellen ist die zügige Anwendung von CDI nach der Erprobung an BSA auf den wichtigen Tumorsuppressor p53 und das Guanylatcyclase-aktivierende-Protein 2 (GCAP-2) in Zusammenarbeit mit Dr. Claudio Iacobucci, Dr. Christian Arlt und Dr. Anne Rehkamp. Während die Anwendung auf p53 die Diskriminierung zwischen zwei konkurrierenden Strukturmodellen des Tetramers erlaubte, lieferten die Experimente mit GCAP-2 komplementäre Strukturinformationen, die mit anderen Reagenzien zuvor nicht erhalten werden konnten. Diese Ergebnisse wurden bereits publiziert [229] und zudem im Rahmen der Promotion von Dr. Rehkamp genutzt. Ozohanics *et al.* benutzen 2023 einen

kombinierten Ansatz, um den Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex und den 2-Oxoadipat-Dehydrogenase-Komplex mittels DSBU und CDI zu modellieren [255].

Neben den oben genannten Eigenschaften von CDI ist neben seiner hohen Reaktivität gegenüber Aminen und Alkoholen besonders seine „spurlose“ Hydrolyse zu nennen. Unreagiertes CDI zerfällt zu CO_2 und Imidazol. Erst eine primäre Reaktion mit einem geeigneten Nukleophil führt zur Bildung der reaktiven, aber mäßig stabilen Azolide, welche im Anschluss Quervernetzungsprodukte vom Typ 1 und 2 bilden können. Einseitig hydrolysierte Quervernetzungsprodukte, welche den Großteil der Typ 0-Produkte darstellen, bauen sich hingegen über die Zwischenstufe der Carbaminsäuren bzw. Kohlensäureestern zu den unmodifizierten Aminosäuren ab (Abbildung 69). Damit kann zum einen die Komplexität der Probe maßgeblich gesenkt und zum anderen die Ausbildung des Folgesequenzen-Problems (vgl. Kapitel 3.3, Das „Folgesequenzen“- Problem) unterbunden werden. Zudem zeigen die gebildeten stabilen Quervernetzungsprodukte die von der Harnstoffspaltung bekannte Ausbildung charakteristischer Massendoublets im Produktionenmassenspektrum. Jedoch muss erwähnt werden, dass die Fragmentierung in MS/MS-Experimenten nicht immer die Identifizierung der quervernetzten Aminosäuren ermöglicht. Dies tritt auf, sobald die betreffende Isocyanat-artige Modifikation einer Ionenserie fehlt. Da das Amin-artige Fragment einer unmodifizierten Aminosäure entspricht, überlappen diese Fragmentationen mit denen der unmodifizierten Peptide.

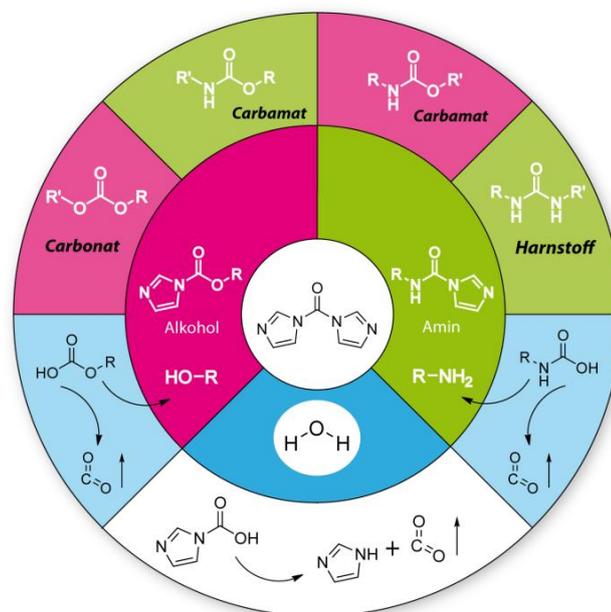


Abbildung 69 Reaktionsverhalten von CDI gegenüber Aminen, Alkoholen und Wasser, nach [256]

9.2 TEMPO-Bz-Cross-Linker

Anhand des Tempo-Bz-Linkers wurde eine Eignung des FRIPS-Prinzips für die Fragmentierung von Quervernetzungsprodukten im (-)-ESI umfassend untersucht. Die gewonnenen Erkenntnisse zur Seitenkettenfragmentierung der Aminosäuren wurden genutzt, um mögliche Neutralverluste der betreffenden Seitenketten einzugrenzen und eine passende Nomenklatur einzuführen. Obwohl das TEMPO-Bz-Linker nur für Peptide eingesetzt wurde, ist eine Anwendung auf Proteine möglich, wenn die betreffende Flüssigkeitschromatographie im alkalischen Milieu durchgeführt wird. Es zeigten sich umfangreiche Fragmentationenspektren, die neben kollisionsinduzierten auch radikalisch-induzierte Fragmentationen aufweisen. Damit ist eine gemischte Fragmentierung der Vorläuferionen gegeben, die prinzipiell eine bessere Sequenzabdeckung ermöglicht. Dennoch bleibt die Auswertung der umfangreichen Spektren herausfordernd und es stehen bislang keine Softwarelösungen zur Verfügung, die eine automatische Zuordnung der Seitenkettenfragmente ermöglichen. Die hier erbrachten Vorarbeiten könnten daher gewinnbringend zur Erweiterung bestehender Annotationsalgorithmen beitragen. Obwohl durch die Ausnutzung des FRIPS-Prinzips prinzipiell einfache CID-MS/MS-fähige Massenspektrometer benutzt werden können, um eine radikalische Peptidsequenzierung vorzunehmen, zeigte sich doch, dass zur zweifelsfreien Zuordnung der Fragmente die Verwendung eines hochauflösenden Massenanalysators, wie der Orbitrap, unabdingbar ist. Zudem zeigte die Verwendung von MS³-basierten Fragmentierungen den höchsten Zugewinn an Sequenzinformation der untersuchten Peptide. Es ist hervorzuheben, dass mittels FRIPS die isobaren Aminosäuren Leucin und Isoleucin unterschieden werden können. Ein Verzicht auf die MS³-basierte Fragmentierung birgt Schwierigkeiten hinsichtlich der eindeutigen Zuordnung von aufgefundenen Seitenkettenfragmentierungen. Dennoch eignet sich die Anwendung FRIPS-basierter spaltbarer Reagenzien auch zur Anwendung in MS/MS-Experimenten, da Dubletts zur zweifelsfreien Massenbestimmung der vernetzten Peptide erhalten werden, auch wenn Seitenkettenfragmentierungen nur noch untergeordnet identifiziert werden können. Es sei erwähnt, dass im Zuge der Weiterentwicklung FRIPS-basierter Reagenzien neuere Arbeiten existieren, die TEMPO-Benzoyl-basierte Reagenzien vorstellen, die in (+)-ESI-Experimenten ohne die heterolytische Spaltung der Nitroxidgruppe angewendet werden können. Zum einen existieren Beispiele in denen der zentrale Benzolring durch einen Pyridinring ersetzt wurde, welcher eine höhere Gasphasenbasizität aufweist und somit Protonierung der Nitroxidgruppe mit anschließender heterolytischer Spaltung unterdrückt [257]. Bemerkenswert ist zudem eine Arbeit von Borotto *et al.* [258], die durch Verwendung des para-Isomers (anstatt des ortho-Isomers) der TEMPO-Bz-Gruppe in Labeling-Experimenten eine verbesserte Ausbeute des

homolytischen Spaltungsprodukts, sowie eine gesteigerte Sequenzabdeckung der von ihnen untersuchten Peptide erzielten. Dabei diskutieren sie mehrere Möglichkeiten wie ein intramolekularer Protonentransfer von der (aus der Benzoylgruppe) gebildeten Amidgruppe auf die Nitroxidgruppe des TEMPO durch die veränderte Struktur unterdrückt wird. Dies könnte in analoger Weise auf den hier verwendeten TEMPO-Bz-Linker übertragen werden und dadurch mutmaßlich die Anwendbarkeit unter (+)-ESI-Bedingungen verbessert werden. Doch selbst wenn dies gelingt, bleibt die generell durch FRIPS erhöhte Komplexität der Spektren für Proteom-weite Untersuchungen hinderlich. Dennoch können FRIPS-basierte Experimente, angewendet auf einfache Proteinsysteme, hilfreiche und ansonsten unzugängliche Strukturinformationen liefern.

9.3 Brom-Urea-Cross-Linker

Obwohl die Einführung eines Massendefekts mittels einer zweifachen Bromierung zunächst vielversprechend wirkte, konnte anhand der Massenspektren und der Simulation von Isotopenmustern für verschiedene Fälle (1,5 kDa, 3 kDa, 6 kDa) gezeigt werden, dass das charakteristische Massendublett mit ~ 4 u Massendifferenz zwischen dem leichtesten und dem schwersten Isotop bei Analytmolekülen $> 1,5$ kDa kaum mehr nutzbar ist. Schon ab einer Masse von ~ 3 kDa wird das 1:2:1 Isotopenmuster der zwei Bromatome vollständig vom natürlichen Isotopenmuster der Peptide ($^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Isotopenmuster) überlagert. Zudem erzeugt die starke Verbreiterung der Isotopenverteilung schwächere Signale, da die Signalintensität sich auf alle Isotope verteilt. Eine Nutzung zur Identifizierung im Rahmen einer *Targeted Mass Difference* wird im Vergleich zur Nutzung eines Gemisches von ausschließlich undeutertem und deutertem Quervernetzungsreagenz (zwei Spezies) zudem durch die gemischte Spezies, welche ein leichtes und ein schweres Bromisotop enthält, erschwert. Obwohl keine Verschiebung der flüssigkeitschromatographischen Elution von leichter und schwerer Spezies zu erwarten ist, kann das Isotopenmuster auf MS-Ebene nicht zur Identifizierung genutzt werden, auch wenn in CID-MS/MS-Experimenten eine vereinfachte Identifizierung von mit Linkerfragmenten modifizierten Fragmentationen zu erwarten ist. Zudem stehen die üblichen Algorithmen zur Dekonvolution von Massenspektren und eine genaue Bestimmung der monoisotopischen Masse einer Verwendung von mehrfach bromierten Spezies aktuell entgegen. Ein Datenexport mit der üblicherweise verwendeten Software *Proteome Discoverer* schlugt fehl und annotierte meist einen beliebigen Isotopenpeak als monoisotopisches Signal. Zudem berücksichtigen die meisten Programme zur Auswertung von Peptid-Produktionenmassenspektren keine Halogene. Obwohl innerhalb der MeroX-Software eigene Definitionen für Elemente eingegeben werden können und somit ein leichtes und ein schweres

Bromisotop als formal getrennte Elemente hinterlegt werden können, misslingen Versuche einer automatisierten Datenanalyse. Beispielhaft sei darauf hingewiesen, dass nach der Isolation der gemischt-bromierten Spezies (ein leichtes und ein schweres Isotop) zwei korrespondierende Paare mit der typischen Massendifferenz der Harnstoffspaltstelle von ~ 26 u entstehen: das Paar der jeweils leichten Isotope des Amins bzw. des Isocyanats und das Paar der jeweils schwereren Isotope. Wurde eine Datenanalyse vorgenommen, die den von harnstoffbasierten Quervernetzungsreagenzien bekannten Umstand ausnutzte, dass die Summe der beiden komplementären Fragmente die Masse des Vorläuferions ergibt, schlug die Datenanalyse fehl. Das leichtere Isotopenpaar hätte eine um ~ 2 u verringerte Masse, das schwerere hingegen eine um ~ 2 u vergrößerte. Es müssten also drei Paare definiert werden, die die Massedifferenzen von leichten und schweren Isotopen berücksichtigen: ~ 24 u für ein schweres Amin zu einem leichten Isocyanat, ~ 26 u für Amin und Isocyanat gleichen Isotops und ~ 28 u für die Differenz von einem leichten Amin zu einem schweren Isocyanat. Selbst in diesem Fall ergäben nur die gemischten Massedifferenzen (als ~ 24 u und ~ 28 u) die Masse eines gemischten Vorläuferions. Daher ist nach aktuellem Kenntnisstand für eine derartig flexible Datenauswertung nur die Software MeroX nutzbar. Durch sie ist es möglich, nur gewisse Fragmentenpaare zwingend vorauszusetzen und dennoch zusätzlich definierte Fragmentationen korrekt zu annotieren.

Im Fall des doppelt bromierten BrPU-Linkers beinhaltet ein zweiter Aspekt der Datenanalyse die Identifizierung eines Quervernetzungsprodukts mit einem unnatürlichen Massendefekt. Wie dargelegt, lassen sich die möglichen Massen tryptischer Peptide berechnen und beim Vorliegen eines Massendefekts, der groß genug ist, verschiebt sich der gemessene m/z -Wert in eine sog. „verbotene Zone“ (vgl. Kapitel 3.4.2, [154], [162]). Diese „verbotenen Zonen“ bilden sich innerhalb der möglichen Vorläufermassen der Peptide in Abhängigkeit des verwendeten Proteoms, dem betrachteten Bereich der Nominalmasse und der verwendeten Protease(n). Dabei zielt die Verwendung des Massendefekts zur Selektion möglicher Vorläuferionen darauf ab, gezielt modifizierte Peptide einer MS/MS-Analyse zu zuführen. Der Nutzung dieser Eigenschaft für Quervernetzungsstudien stehen aber mehrere Argumente entgegen. Sehr kritisch ist die Notwendigkeit, zuvor mögliche Kandidaten aus einer Peptidbibliothek zu berechnen, um eine gezielte Fragmentierung dieser Kandidaten auszulösen. Obwohl diese Berechnungen für tryptische Peptide umfassend durch Nefedov *et al.* durchgeführt wurden [259], beschränken sich existierende Datenbanken auf unmodifizierte tryptische Peptide. Es ist einleuchtend, dass dies für alle zurzeit verwendeten Proteasen mit mehreren verpassten Spaltstellen wiederholt und hinterlegt werden müsste. Zudem müsste dieser Datensatz nachträglich um zu berücksichtigende Modifikationen (z.B. Acetylierung, Phosphorylierung,

Carbamidomethylierung, Carbamoylierung) der Peptidkette erweitert werden. Da jedoch keine Peptide, sondern Quervernetzungsprodukte (Typ 0, Typ 1 und Typ 2) untersucht werden sollen, würde sich der Suchraum für jede betrachtete Peptidatenbank mit N Peptiden auf mehr als $N^2/2$ (n^2 -Problem) erhöhen. Die auch in dieser Arbeit verwendete Strategie einer sequenziellen Proteolyse mit mehreren Proteasen müsste zudem berücksichtigt werden. Dabei muss sich die Vergrößerung des verwendeten Massendefekts nicht zwingend positiv auf die Identifikation auswirken, wie Spengler *et al.* in [165] darlegen. Während bei der dort verwendeten massendefizienten einfachen Phosphorylierung und einer verwendeten Massengenauigkeit von 0,1 μ noch 50% der Peptide bis zu einer Masse von $\sim 1,8$ kDa zugeordnet werden können, verringerte sich bei doppelter Phosphorylierung dieser Wert auf $\sim 1,4$ kDa. Soll das Massenspektrometer im Rahmen einer LC-MS/MS-Analyse zudem anhand der hochgenauen Masse eine Vorauswahl treffen, welche Vorläuferionen fragmentiert werden sollen, müssten alle betreffenden Massen (im Gerät/ der Software) hinterlegt werden und dann während der Messung in Echtzeit („*on the fly*“) abgerufen und abgeglichen werden können. Es erscheint nicht zielführend, anhand dieser Kriterien den BrPU-Linker generell für die Proteinstrukturanalyse einzusetzen.

Jedoch offenbart sich eine einfache und zunächst nicht naheliegende Variante, den BrPU-Linker dennoch zu nutzen. Von hoher Praxisrelevanz ist die zunächst kontraproduktiv wirkende Verbreiterung der Isotopensignatur. Wie Artemenko *et al.* schlüssig darlegten, lassen sich anhand der natürlichen Isotopenverteilung einfache Parameter über deren Breite und die Verschiebung zwischen monoisotopischen und intensivsten Isotopenpeak ableiten [156]. Diese Parameter sind in Echtzeit zu bestimmen und sie führen ähnlich der „verbotenen Zonen“ zur Klassifizierung der Analytspezies. Besonders die Verbreiterung der Isotopensignatur der zweifach bromierten Spezies hätte auf diese Parameter einen großen Einfluss. Eine Auswahl der Vorläuferionen würde darauf beruhen, dass jene Ionen für eine Fragmentierung ausgewählt werden, die für ihre Masse (in Echtzeit berechnet aus m/z -Wert und Ladungszahl) eine viel zu breite Isotopenverteilung aufweisen. Dies ist exemplarisch in Abbildung 70 für verschiedene bromierte und nicht-bromierte Peptidzusammensetzungen dargestellt [152]. Für eine Masse von ~ 3 kDa wäre eine Breite der Isotopenverteilung von fünf Signalen zu erwarten. Eine einfach bromierte Spezies weist bereits eine Breite von sieben und eine doppelt bromierte von neun Signalen auf. Ein möglicher Kritikpunkt ist die Verbreiterung der Isotopenverteilung durch die doppelte Bromierung bei ~ 10 kDa, die kaum mehr ins Gewicht fallen würde. Demgegenüber sei aber erwähnt, dass üblicherweise Quervernetzungsprodukte nur bis zu einer Masse von ~ 6 kDa sicher identifiziert werden.

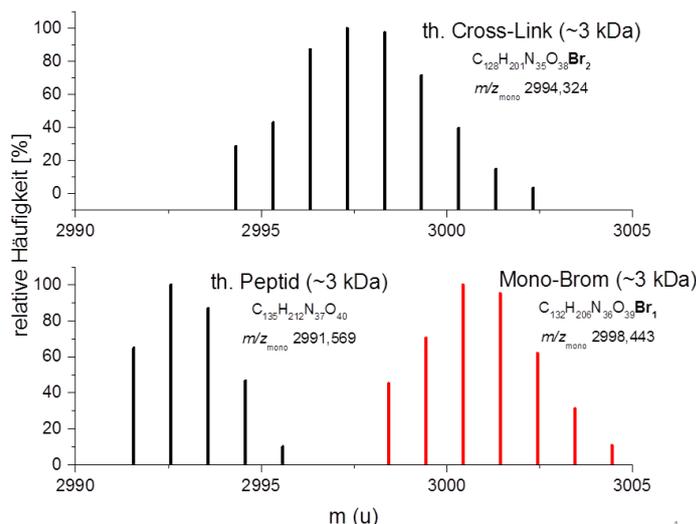


Abbildung 70 Simulierte Isotopenmuster eines doppelt bromierten Peptids (oben), einer einfach bromierten Spezies (rot, unten) und eines unbromierten Peptids (schwarz, unten) mit ~ 3 kDa

Demnach würden nur die verbreiterten Isotopenverteilungen untersucht werden. Damit wären unmodifizierte Peptide automatisch ausgeschlossen. Ergäbe sich durch zwei überlappende Isotopenverteilungen zweier Spezies zufällig eine derart breite Verteilung, würde diese zwar fälschlicherweise fragmentiert, jedoch würden im Produktionenmassenspektrum der koisolierten Spezies die charakteristischen Muster der Harnstoffspaltstelle und der 1:1 Isotopenverteilung mit einer Massendifferenz von ~ 2 u fehlen.

Für den BrPU-Linker und sein Fragmentierungsverhalten stehen verschiedene Gründe seiner breiten Verwendung für die Proteinstrukturanalyse entgegen. Zum einen ist der BrPU-Linker nahezu unlöslich in Wasser. Zum anderen neigt er durch seine starre Struktur sowie seine unpolare und aromatische Natur zur Bildung von Gasphasenaddukten. Selbst eine Derivatisierung der NHS-Ester zu Sulfo-NHS-Estern würde dieses Problem nicht beheben, da das Quervernetzungsprodukt von der Art des Aktivesters unberührt bleibt. Die gewonnenen Tandemmassenspektren zeigen im Vergleich zum ähnlich großen TEMPO-Bz-Linker eine schlechte Fragmentierung der Peptidketten, übermäßig viele Neutralverluste und schon für die Tripeptide nicht vorhersagbare Fragmentierungsmuster. Mutmaßlich rührt dies von einer Neigung zur Bildung von „ π -Stacks“ zwischen den zwei aromatischen Ringen und somit einer gewissen „Steifheit“ der Verbindung als auch des Quervernetzungsprodukts. Dies begünstigt zudem die Neigung zur Bildung von Gasphasenaddukten durch „ π -Stacks“. Eine starre Struktur würde zudem zu einer gewissen Hemmung der Ausbreitung vibratorischer Anregung führen, wie sie in der CID-MS/MS ausgenutzt wird. Folglich wären dies auch eine Erklärung für die außergewöhnlichen Fragmentationenspektren. Um dem vorzubeugen und gleichzeitig die Löslichkeit des Reagenzes zu erhöhen, werden hier zwei Veränderungen der Struktur vorgeschlagen: Zunächst sollte zwischen der Harnstoffgruppe und den aromatischen Ringen

jeweils mindestens eine Methylengruppe eingefügt werden. Wenn die aromatischen Ringe selbst protonierbare oder dauerhaft geladene Gruppen tragen, wäre eine verbesserte Wasserlöslichkeit gegeben. Tertiäre oder quartäre Amine an den aromatischen Ringen würden die Löslichkeit verbessern, den Ladungszustand im (+)-ESI erhöhen, und durch die Coulomb-Abstoßung die Bildung von Gasphasenaddukten vermindern (Abbildung 71).

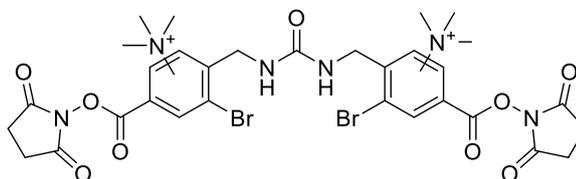


Abbildung 71 Strukturvorschlag eines modifizierten BrPU-Linkers, beispielhaft mit zwei quartären Aminen, ohne Gegenionen

9.4 Imidodicarbonsäurediimidazol-Cross-Linker

Durch seine relativ leichte Zugänglichkeit aus CDI und Kaliumcyanat stellt der IDDI-Linker eine interessante Alternative zu CDI dar. Einerseits konnte anhand von Modellpeptiden gezeigt werden, dass die für harnstoffbasierte Spaltstellen typischen Massendoublets (~ 26 u) auch für Biuret-basierte Spaltstellen entstehen und durch weitere Massendoublets mit ~ 43 u ergänzt werden. Des Weiteren weisen die HCD-Fragmentationsspektren die für harnstoffbasierte Quervernetzungsprodukte typischen gemischten Fragmentierungen in *Linker*-Fragmente und β - bzw. γ -Fragmentationen der Peptidketten auf. Somit ermöglicht auch das IDDI-Reagenz neben den harnstoffbasierten Linkern DSBU und CDI die Aufnahme von MS/MS-Daten, welche sowohl zur automatischen Identifizierung von Quervernetzungsprodukten durch charakteristische Massendoublets, als auch zur gleichzeitigen Ableitung von Sequenzinformationen der quervernetzten Peptide geeignet sind. Daher sind auch Biuret-basierte Reagenzien geeignet, eine automatisierte Auswertung von MS/MS-Daten zur Identifikation von Quervernetzungsprodukten zu ermöglichen, wie sie bereits für DSBU, CDI und Diallylurea (DAU, [237]) etabliert wurde.

Zudem stellt das IDDI-Reagenz in gewissem Sinne eine längere Version des CDI dar, da mittels des IDDI-Reagenz C_{α} - C_{α} -Abstände von ~ 18 Å (für zwei Lysine) überbrückbar sind. Dieser längere überbrückbare Abstand ermöglicht die Bildung von zusätzlichen Quervernetzungsprodukten, welche durch CDI nicht mehr vernetzt werden können. Obwohl die Löslichkeit des IDDI-Reagenzes begrenzt ist, konnte seine Anwendbarkeit in gepufferten, wässrigen Peptidlösungen gezeigt werden. Dabei wurde eine Konzentration des Reagenz verwendet, wie sie für Proteinstudien üblich ist. Daraus ergeben sich ideale Voraussetzungen für weiterführende Untersuchungen an Proteinsystemen. In analoger Weise zu CDI kann die

Reaktivität des IDDI-Reagenzes mit verschiedenen Azoliden weiter angepasst werden. Durch die zentrale Imidgruppe ist eine Position für weitere Modifikationen des Reagenzes verfügbar, was eine weitergehende Synthese von trifunktionellen Vernetzungsreagenzien ermöglicht.

10 Literaturverzeichnis

- [1] E. S. Lander *et al.*, “Initial sequencing and analysis of the human genome,” *Nature*, vol. 409, no. 6822, pp. 860–921, Feb. 2001.
- [2] J. C. Venter *et al.*, “The Sequence of the Human Genome,” *Science (80-.)*, vol. 291, no. 5507, pp. 1304–1351, Feb. 2001.
- [3] “Human Genome News Archive Edition July 2001,” *Hum. Genome Program, U.S. Dep. Energy, Hum. Genome News (v11n3-4)*, vol. 11, no. 3–4, 2021.
- [4] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, and L. Stryer, *Stryer Biochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018.
- [5] L. J. Banaszak, *Foundations of Structural Biology*. Elsevier, 2000.
- [6] J. B. Fenn, “Electrospray Wings for Molecular Elephants (Nobel Lecture),” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 42, no. 33, pp. 3871–3894, Aug. 2003.
- [7] R. Aebersold and M. Mann, “Mass spectrometry-based proteomics,” *Nature*, vol. 422, no. 6928, pp. 198–207, Mar. 2003.
- [8] H. Zhong, Y. Zhang, Z. Wen, and L. Li, “Protein sequencing by mass analysis of polypeptide ladders after controlled protein hydrolysis,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 22, no. 10, pp. 1291–1296, Oct. 2004.
- [9] J. Seidler, N. Zinn, M. E. Boehm, and W. D. Lehmann, “De novo sequencing of peptides by MS/MS,” *Proteomics*, vol. 10, no. 4, pp. 634–649, 2010.
- [10] F. Lottspeich and J. W. Engels, *Bioanalytik*, 3rd ed. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2012.
- [11] A. Sinz and K. Wang, “Mapping spatial proximities of sulfhydryl groups in proteins using a fluorogenic cross-linker and mass spectrometry,” *Anal. Biochem.*, vol. 331, no. 1, pp. 27–32, 2004.
- [12] G. H. Dihazi and A. Sinz, “Mapping low-resolution three-dimensional protein structures using chemical cross-linking and Fourier transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 17, no. 17, pp. 2005–2014, 2003.
- [13] A. Schmidt, S. Kalkhof, C. Ihling, D. Cooper, and A. Sinz, “Mapping protein interfaces by chemical cross-linking and FTICR mass spectrometry: application to a calmodulin / adenylyl cyclase 8 peptide complex,” *Eur. J. Mass Spectrom.*, vol. 11, no. 1, p. 525, 2005.
- [14] H. Zahn and H. Pfannmüller, “[Reactions of 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene and p, p'-difluoro-m, m'-dinitrodiphenyl-sulfone with imidazole, 4(5)-methylimidazole and L-histidine].,” *Biochem. Z.*, vol. 330, no. 2, pp. 97–107, 1958.
- [15] H. Brazil and J. Sri Ram, “Enrichment of proteins with amino acid residues, employing p, p'-difluoro-m, m'-dinitrodiphenyl sulfone,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 110, no. 1, pp. 205–209, Apr. 1965.
- [16] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*. Elsevier, 1996.
- [17] M. Wilm *et al.*, “Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry,” *Nature*, vol. 379, no. 6564, pp. 466–469, Feb. 1996.

- [18] J. H. Gross, *Mass Spectrometry*. Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- [19] X. Tang and J. E. Bruce, "A new cross-linking strategy: protein interaction reporter (PIR) technology for protein–protein interaction studies," *Mol. Biosyst.*, vol. 6, no. 6, p. 939, 2010.
- [20] L. Yang *et al.*, "In VIVO application of photocleavable protein interaction reporter technology," *J. Proteome Res.*, vol. 11, no. 2, pp. 1027–1041, 2012.
- [21] X. Zhong, A. T. Navare, J. D. Chavez, J. K. Eng, D. K. Schweppe, and J. E. Bruce, "Large-Scale and Targeted Quantitative Cross-Linking MS Using Isotope-Labeled Protein Interaction Reporter (PIR) Cross-Linkers," *J. Proteome Res.*, vol. 16, no. 2, 2017.
- [22] L. Piersimoni, P. L. Kastritis, C. Arlt, and A. Sinz, "Cross-Linking Mass Spectrometry for Investigating Protein Conformations and Protein–Protein Interactions—A Method for All Seasons," *Chem. Rev.*, vol. 122, no. 8, pp. 7500–7531, Apr. 2022.
- [23] F. J. O'Reilly *et al.*, "Protein complexes in cells by AI-assisted structural proteomics," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 19, no. 4, Apr. 2023.
- [24] G. Taylor, "Disintegration of Water Drops in an Electric Field," *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 280, no. 1382, pp. 383–397, Jul. 1964.
- [25] A. Gomez and K. Tang, "Charge and fission of droplets in electrostatic sprays," *Phys. Fluids*, vol. 6, no. 1, pp. 404–414, Jan. 1994.
- [26] C. O'Driscoll, "Keeping it together," 2003. [Online]. Available: <http://www.rsc.org/chemistryworld/Issues/2003/February/together.asp>.
- [27] L. Rayleigh, "On the Capillary Phenomena of Jets," *Proc. R. Soc. London*, vol. 29, no. 196–199, pp. 71–97, Jan. 1879.
- [28] Lord Rayleigh, "XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity," *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.*, vol. 14, no. 87, pp. 184–186, Sep. 1882.
- [29] M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, and M. B. Alice, "Molecular Beams of Macroions," *J. Chem. Phys.*, vol. 49, no. 5, pp. 2240–2249, Sep. 1968.
- [30] M. Yamashita and J. B. Fenn, "Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme," *J. Phys. Chem.*, vol. 88, no. 20, pp. 4451–4459, Sep. 1984.
- [31] C. K. Meng, M. Mann, and J. B. Fenn, "Of protons or proteins," *Zeitschrift für Phys. D Atoms, Mol. Clust.*, vol. 10, no. 2–3, pp. 361–368, Jun. 1988.
- [32] M. Karas and F. Hillenkamp, "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons," *Anal. Chem.*, vol. 60, no. 20, pp. 2299–2301, Oct. 1988.
- [33] L. Konermann, E. Ahadi, A. D. Rodriguez, and S. Vahidi, "Unraveling the mechanism of electrospray ionization.," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 1, pp. 2–9, Jan. 2013.
- [34] G. J. Van Berkel, F. Zhou, and J. T. Aronson, "Changes in bulk solution pH caused by the inherent controlled-current electrolytic process of an electrospray ion source," *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, vol. 162, no. 1–3, pp. 55–67, Mar. 1997.
- [35] J. V. Iribarne, "On the evaporation of small ions from charged droplets," *J. Chem. Phys.*, vol. 64, no. 6, p. 2287, 1976.

- [36] M. Dole, "Molecular Beams of Macroions," *J. Chem. Phys.*, vol. 49, no. 5, p. 2240, 1968.
- [37] C. J. Hogan, J. a Carroll, H. W. Rohrs, P. Biswas, and M. L. Gross, "Combined charged residue-field emission model of macromolecular electrospray ionization.," *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 1, pp. 369–77, Jan. 2009.
- [38] L. Konermann, A. D. Rodriguez, and J. Liu, "On the formation of highly charged gaseous ions from unfolded proteins by electrospray ionization," *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 15, pp. 6798–6804, 2012.
- [39] A. El-Faramawy, K. W. M. Siu, and B. A. Thomson, "Efficiency of nano-electrospray ionization," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 16, no. 10, pp. 1702–1707, Oct. 2005.
- [40] T. R. Covey, B. A. Thomson, and B. B. Schneider, "Atmospheric pressure ion sources.," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 28, no. 6, pp. 870–97, 2009.
- [41] M. C. Kuprowski, B. L. Boys, and L. Konermann, "Analysis of protein mixtures by electrospray mass spectrometry: effects of conformation and desolvation behavior on the signal intensities of hemoglobin subunits.," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 18, no. 7, pp. 1279–85, Jul. 2007.
- [42] J. A. Loo, "Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–23, 1997.
- [43] A. Konijnenberg, A. Butterer, and F. Sobott, "Native ion mobility-mass spectrometry and related methods in structural biology.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1834, no. 6, pp. 1239–56, Jun. 2013.
- [44] W. Paul, "Electromagnetic traps for charged and neutral particles," *Rev. Mod. Phys.*, vol. 62, no. 3, pp. 531–540, Jul. 1990.
- [45] W. Paul and H. Steinwedel, "Notizen: Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld," *Zeitschrift für Naturforsch. A*, vol. 8, no. 7, pp. 448–450, Jul. 1953.
- [46] R. H. Perry, R. G. Cooks, and R. J. Noll, "Orbitrap mass spectrometry: Instrumentation, ion motion and applications," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 27, no. 6, pp. 661–699, Nov. 2008.
- [47] R. J. Flanagan, A. Taylor, I. D. Watson, and R. Whelpton, *Fundamentals of Analytical Toxicology*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2008.
- [48] É. Mathieu, "Memoire sur le Mouvement Vibratoire d'une Membrane de Forme Elliptique.," *J. Math. Pures Appl.*, vol. 13, pp. 137–203, 1868.
- [49] P. E. Miller and M. B. Denton, "The transmission properties of an RF-only quadrupole mass filter," *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, vol. 72, no. 3, pp. 223–238, Oct. 1986.
- [50] D. J. Douglas, A. J. Frank, and D. Mao, "Linear ion traps in mass spectrometry," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 24, no. 1, pp. 1–29, Jan. 2005.
- [51] J. C. Schwartz, M. W. Senko, and J. E. P. Syka, "A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 13, no. 6, pp. 659–669, 2002.
- [52] A. A. Makarov, "Orbitrap Mass Spectrometer - US Patent No. 5,886,346," 1999.
- [53] K. H. Kingdon, "A Method for the Neutralization of Electron Space Charge by Positive Ionization at Very Low Gas Pressures," *Phys. Rev.*, vol. 21, no. 4, pp. 408–418, Apr. 1923.
- [54] R. D. Knight, "Storage of ions from laser-produced plasmas," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 38,

- no. 4, pp. 221–223, 1981.
- [55] A. Makarov, “Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis,” *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 6, pp. 1156–1162, Mar. 2000.
- [56] R. A. Zubarev and A. Makarov, “Orbitrap mass spectrometry,” *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 11, pp. 5288–5296, 2013.
- [57] E. M. Schmidt *et al.*, “Petroleomics via Orbitrap mass spectrometry with resolving power above 1 000 000 at m/z 200,” *RSC Adv.*, vol. 8, no. 11, pp. 6183–6191, 2018.
- [58] E. S. Hecht, M. Scigelova, S. Eliuk, and A. Makarov, “Fundamentals and Advances of Orbitrap Mass Spectrometry,” in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Wiley, 2019, pp. 1–40.
- [59] R. Kiyonami, “Profiling and annotation of flavonoids using a product ion-dependent MSn data acquisition method on a Tribrid Orbitrap mass spectrometer,” in *Metabolomics 2018*, 2018.
- [60] T. Scientific, “Improved Sensitivity Through Enhanced Ion Transmission Using an S-Lens on the LTQ Velos Linear Ion Trap Improved Sensitivity Through Enhanced Ion Transmission Using an S-Lens on the LTQ Velos Linear Ion Trap,” *Product Support Bulletin*, PSB 128, 2009. [Online]. Available: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/PSB-128-Improved-Sensitivity-Through-Enhanced-Ion-Transmission-Using-an-S-Lens.pdf>.
- [61] J. V. Olsen *et al.*, “A Dual Pressure Linear Ion Trap Orbitrap Instrument with Very High Sequencing Speed,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 8, no. 12, pp. 2759–2769, Dec. 2009.
- [62] J. J. Coon *et al.*, “Protein identification using sequential ion/ion reactions and tandem mass spectrometry,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 27, pp. 9463–9468, 2005.
- [63] L. Earley *et al.*, “Implementation of a Multipurpose Glow Discharge Ion Source for the Introduction of Reagent/Calibrant Ions into a Hybrid Mass Spectrometer,” p. 90, 2000.
- [64] D. F. Hunt, J. J. Coon, J. E. P. Syka, and J. A. Marto, “Electron Transfer Dissociation for Biopolymer Sequence Analysis,” US 2005/0199804 A1, 2005.
- [65] C. K. Frese *et al.*, “Improved Peptide Identification by Targeted Fragmentation Using CID, HCD and ETD on an LTQ-Orbitrap Velos,” *J. Proteome Res.*, vol. 10, no. 5, pp. 2377–2388, May 2011.
- [66] Thermo Fischer Scientific, “Normalized Collision Energy Technology,” *Product Support Bulletin*, PSB 104. [Online]. Available: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/PSB104-Normalized-Collision-Energy-Technology-EN.pdf>.
- [67] A. Michalski, N. Neuhauser, J. Cox, and M. Mann, “A systematic investigation into the nature of tryptic HCD spectra,” *J. Proteome Res.*, vol. 11, no. 11, pp. 5479–5491, 2012.
- [68] Y. Xia, X. Liang, and S. A. McLuckey, “Ion Trap versus Low-Energy Beam-Type Collision-Induced Dissociation of Protonated Ubiquitin Ions,” *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 4, pp. 1218–1227, Feb. 2006.
- [69] J. Murrell, D. Despeyroux, S. A. Lammert, J. L. Stephenson, and D. E. Goeringer, “‘Fast excitation’ CID in a quadrupole ion trap mass spectrometer,” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 14, no. 7, pp. 785–789, Jul. 2003.

- [70] T. Pekar Second *et al.*, “Dual-Pressure Linear Ion Trap Mass Spectrometer Improving the Analysis of Complex Protein Mixtures,” *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 18, pp. 7757–7765, Sep. 2009.
- [71] R. Kiyonami, I. Sakane, S. Sharma, G. Mcalister, C. Ding, and A. Huhmer, “Flavonoid Annotation Using a Product Ion-Dependent MSⁿ Data Acquisition Method on a Tribrid Orbitrap Mass Spectrometer,” p. 65301, 2018.
- [72] D. H. Campbell, E. Luescher, and L. S. Lerman, “Immunologic Adsorbents: I. Isolation of Antibody by Means of a Cellulose-Protein Antigen.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 37, no. 9, pp. 575–8, Sep. 1951.
- [73] S. Avrameas and T. Ternynck, “The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoabsorbents.,” *Immunochemistry*, vol. 6, no. 1, pp. 53–66, Jan. 1969.
- [74] S. S. Wong and L.-J. C. Wong, “Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 14, no. 11, pp. 866–874, Nov. 1992.
- [75] C. Yu and L. Huang, “Cross-Linking Mass Spectrometry: An Emerging Technology for Interactomics and Structural Biology,” *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 1, pp. 144–165, Jan. 2018.
- [76] G. A. Korshunova, N. V. Sumbatyan, A. N. Topin, and M. T. Mtchedlidze, “Photoactivatable Reagents Based on Aryl(trifluoromethyl)diazirines: Synthesis and Application for Studying Nucleic Acid–Protein Interactions,” *Mol. Biol.*, vol. 34, no. 6, pp. 823–839, 2000.
- [77] M. Suchanek, A. Radzikowska, and C. Thiele, “Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells,” *Nat. Methods*, vol. 2, no. 4, pp. 261–268, Apr. 2005.
- [78] K. Kölbl, C. H. Ihling, and A. Sinz, “Analyse von Sekundärstrukturen in Peptiden mithilfe photoaktivierbarer Aminosäureanaloga,” *Angew. Chemie*, vol. 124, no. 50, pp. 12770–12774, 2012.
- [79] N. D. Pham, R. B. Parker, and J. J. Kohler, “Photocrosslinking approaches to interactome mapping,” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 17, no. 1, pp. 90–101, Feb. 2013.
- [80] S. Lin, D. He, T. Long, S. Zhang, R. Meng, and P. R. Chen, “Genetically Encoded Cleavable Protein Photocrosslinker.,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, no. 34, pp. 1–31, Aug. 2014.
- [81] A. Sinz, “Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein–protein interactions,” *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 25, no. 4, pp. 663–682, Jul. 2006.
- [82] N. S. Green, E. Reisler, and K. N. N. Houk, “Quantitative evaluation of the lengths of homobifunctional protein cross-linking reagents used as molecular rulers,” *Protein Sci.*, vol. 10, no. 7, pp. 1293–1304, Dec. 2008.
- [83] S. Kalkhof, S. Haehn, M. Paulsson, N. Smyth, J. Meiler, and A. Sinz, “Computational modeling of laminin N-terminal domains using sparse distance constraints from disulfide bonds and chemical cross-linking,” *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 78, no. 16, pp. 3409–3427, Dec. 2010.
- [84] A. Leitner *et al.*, “Probing native protein structures by chemical cross-linking, mass spectrometry, and bioinformatics.,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 9, no. 8, pp. 1634–49, 2010.

- [85] A. Kahraman, F. Herzog, A. Leitner, G. Rosenberger, R. Aebersold, and L. Malmström, "Cross-Link Guided Molecular Modeling with ROSETTA," *PLoS One*, vol. 8, no. 9, 2013.
- [86] T. Hofmann, A. W. Fischer, J. Meiler, and S. Kalkhof, "Protein structure prediction guided by crosslinking restraints – A systematic evaluation of the impact of the crosslinking spacer length," *Methods*, vol. 89, pp. 79–90, Nov. 2015.
- [87] R. F. Rivera-Santiago, S. Sriswasdi, S. L. Harper, and D. W. Speicher, "Probing structures of large protein complexes using zero-length cross-linking," *Methods*, vol. 89, pp. 99–111, Nov. 2015.
- [88] M. Schneider, A. Belsom, J. Rappsilber, and O. Brock, "Blind testing of cross-linking/mass spectrometry hybrid methods in CASP11," *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 84, no. October 2015, pp. 152–163, 2016.
- [89] G. W. Anderson, J. E. Zimmerman, and F. M. Callahan, "The Use of Esters of N-Hydroxysuccinimide in Peptide Synthesis," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 86, no. 9, pp. 1839–1842, May 1964.
- [90] J. V. Staros, "N-hydroxysulfosuccinimide active esters: bis(N-hydroxysulfosuccinimide) esters of two dicarboxylic acids are hydrophilic, membrane-impermeant, protein cross-linkers," *Biochemistry*, vol. 21, no. 17, pp. 3950–3955, Aug. 1982.
- [91] P. F. Pilch and M. P. Czech, "Interaction of cross-linking agents with the insulin effector system of isolated fat cells. Covalent linkage of 125I-insulin to a plasma membrane receptor protein of 140,000 daltons.," *J. Biol. Chem.*, vol. 254, no. 9, pp. 3375–81, May 1979.
- [92] R. F. R. Church and M. J. Weiss, "Diazirines. II. Synthesis and Properties of Small Functionalized Diazirine Molecules. Some Observations on the Reaction of a Diaziridine with the Iodine-Iodide Ion System," *J. Org. Chem.*, vol. 35, no. 8, pp. 2465–2471, 1970.
- [93] P. T. Kasper *et al.*, "An aptly positioned azido group in the spacer of a protein cross-linker for facile mapping of lysines in close proximity," *ChemBioChem*, vol. 8, no. 11, pp. 1281–1292, 2007.
- [94] J. W. Back *et al.*, "A new crosslinker for mass spectrometric analysis of the quaternary structure of protein complexes," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 12, no. 2, pp. 222–227, Feb. 2001.
- [95] N. L. Kelleher, "Top-down proteomics.," *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 11, pp. 197A-203A, Jun. 2004.
- [96] G. E. Reid and S. A. McLuckey, "'Top down' protein characterization via tandem mass spectrometry," *J. Mass Spectrom.*, vol. 37, no. 7, pp. 663–675, Jul. 2002.
- [97] B. Macek, L. F. Waanders, J. V. Olsen, and M. Mann, "Top-down protein sequencing and MS3 on a hybrid linear quadrupole ion trap-orbitrap mass spectrometer," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 5, no. 5, pp. 949–958, 2006.
- [98] C. Y. Park, A. A. Klammer, L. Käll, M. J. MacCoss, and W. S. Noble, "Rapid and Accurate Peptide Identification from Tandem Mass Spectra," *J. Proteome Res.*, vol. 7, no. 7, pp. 3022–3027, Jul. 2008.
- [99] A. Shevchenko *et al.*, "Rapid 'de novo' peptide sequencing by a combination of nanoelectrospray, isotopic labeling and a quadrupole/time-of-flight mass

- spectrometer,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 11, no. 9, pp. 1015–1024, Jun. 1997.
- [100] A. Shevchenko, I. Chernushevich, M. Wilm, and M. Mann, “De Novo Peptide Sequencing by Nanoelectrospray Tandem Mass Spectrometry Using Triple Quadrupole and Quadrupole/Time-of-Flight Instruments,” in *Mass Spectrometry of Proteins and Peptides*, New Jersey: Humana Press, 2000, pp. 1–16.
- [101] I. K. Chu *et al.*, “Proposed nomenclature for peptide ion fragmentation,” *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 390, pp. 24–27, Nov. 2015.
- [102] P. Roepstorff and J. Fohlman, “Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass Spectra of Peptides,” *Biol. Mass Spectrom.*, vol. 11, no. 11, pp. 601–601, Nov. 1984.
- [103] R. S. Johnson, S. A. Martin, K. Biemann, J. T. Stults, and J. T. Watson, “Novel Fragmentation Process of Peptides by Collision-Induced Decomposition in a Tandem Mass Spectrometer: Differentiation of Leucine and Isoleucine,” *Anal. Chem.*, vol. 59, no. 21, pp. 2621–2625, Nov. 1987.
- [104] K. Biemann, “Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure,” *Biol. Mass Spectrom.*, vol. 16, no. 1–12, pp. 99–111, Oct. 1988.
- [105] K. Biemann, “Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions),” *Methods Enzymol.*, vol. 193, no. C, pp. 886–887, 1990.
- [106] Matrix Science, “Peptide fragmentation.” [Online]. Available: http://www.matrixscience.com/help/fragmentation_help.html.
- [107] R. S. Johnson, S. A. Martin, and K. Biemann, “Collision-induced fragmentation of (M + H)⁺ ions of peptides. Side chain specific sequence ions,” *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, vol. 86, no. C, pp. 137–154, Dec. 1988.
- [108] B. Schilling, R. H. Row, B. W. Gibson, M. M. Young, X. Guo, and M. M. Young, “MS2Assign, automated assignment and nomenclature of tandem mass spectra of chemically crosslinked peptides,” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 14, no. 8, pp. 834–850, Aug. 2003.
- [109] A. Heinz *et al.*, “In vitro cross-linking of elastin peptides and molecular characterization of the resultant biomaterials,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1830, no. 4, pp. 2994–3004, Apr. 2013.
- [110] N. I. Brodie, E. V. Petrotchenko, and C. H. Borchers, “The novel isotopically coded short-range photo-reactive crosslinker 2,4,6-triazido-1,3,5-triazine (TATA) for studying protein structures,” *J. Proteomics*, vol. 149, no. 2015, pp. 69–76, Oct. 2016.
- [111] A. Sinz, “Divide and conquer: cleavable cross-linkers to study protein conformation and protein–protein interactions,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 409, no. 1, pp. 33–44, Jan. 2017.
- [112] M. I. Rasmussen, J. C. Refsgaard, L. Peng, G. Houen, and P. Højrup, “CrossWork: Software-assisted identification of cross-linked peptides,” *J. Proteomics*, vol. 74, no. 10, pp. 1871–1883, Sep. 2011.
- [113] M. J. Trnka, P. R. Baker, P. J. J. Robinson, A. L. Burlingame, and R. J. Chalkley, “Matching Cross-linked Peptide Spectra: Only as Good as the Worse Identification,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 13, no. 2, pp. 420–434, Feb. 2014.
- [114] C. Iacobucci and A. Sinz, “To Be or Not to Be? Five Guidelines to Avoid Misassignments in Cross-Linking/Mass Spectrometry,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 15,

- pp. 7832–7835, Aug. 2017.
- [115] J. Rappsilber, S. Siniosoglou, E. C. Hurt, and M. Mann, “A Generic Strategy To Analyze the Spatial Organization of Multi-Protein Complexes by Cross-Linking and Mass Spectrometry,” *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 2, pp. 267–275, Jan. 2000.
- [116] S. Kalkhof, C. Ihling, K. Mechtler, and A. Sinz, “Chemical Cross-Linking and High-Performance Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry for Protein Interaction Analysis: Application to a Calmodulin/Target Peptide Complex,” *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 2, pp. 495–503, Jan. 2005.
- [117] D. R. Müller *et al.*, “Isotope-Tagged Cross-Linking Reagents. A New Tool in Mass Spectrometric Protein Interaction Analysis,” *Anal. Chem.*, vol. 73, no. 9, pp. 1927–1934, May 2001.
- [118] K. M. Pearson, L. K. Pannell, and H. M. Fales, “Intramolecular cross-linking experiments on cytochrome c and ribonuclease A using an isotope multiplet method,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 16, no. 3, pp. 149–159, Feb. 2002.
- [119] J. Seebacher, P. Mallick, N. Zhang, J. S. Eddes, R. Aebersold, and M. H. Gelb, “Protein Cross-Linking Analysis Using Mass Spectrometry, Isotope-Coded Cross-Linkers, and Integrated Computational Data Processing,” *J. Proteome Res.*, vol. 5, no. 9, pp. 2270–2282, Sep. 2006.
- [120] F. Liu, P. Lössl, R. Scheltema, R. Viner, and A. J. R. Heck, “Optimized fragmentation schemes and data analysis strategies for proteome-wide cross-link identification,” *Nat. Commun.*, vol. 8, no. May, 2017.
- [121] M. Turowski *et al.*, “Deuterium Isotope Effects on Hydrophobic Interactions: The Importance of Dispersion Interactions in the Hydrophobic Phase,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 45, pp. 13836–13849, Nov. 2003.
- [122] E. V. Petrotchenko, V. K. Olkhovik, and C. H. Borchers, “Isotopically Coded Cleavable Cross-linker for Studying Protein-Protein Interaction and Protein Complexes,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 4, no. 8, pp. 1167–1179, Aug. 2005.
- [123] A. Leitner *et al.*, “Chemical cross-linking/mass spectrometry targeting acidic residues in proteins and protein complexes,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 26, pp. 9455–9460, Jul. 2014.
- [124] C. Yu, W. Kandur, A. Kao, S. Rychnovsky, and L. Huang, “Developing New Isotope-Coded Mass Spectrometry-Cleavable Cross-Linkers for Elucidating Protein Structures,” *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 4, pp. 2099–2106, Feb. 2014.
- [125] E. V. Petrotchenko and C. H. Borchers, “ICC-CLASS: isotopically-coded cleavable crosslinking analysis software suite,” *BMC Bioinformatics*, vol. 11, p. 64, 2010.
- [126] F. Schmidt *et al.*, “Complementary analysis of the Mycobacterium tuberculosis proteome by two-dimensional electrophoresis and isotope-coded affinity tag technology,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 3, no. 1, pp. 24–42, 2004.
- [127] T. Walzthoeni *et al.*, “xTract: software for characterizing conformational changes of protein complexes by quantitative cross-linking mass spectrometry,” *Nat. Methods*, vol. 12, no. 12, pp. 1185–1190, Dec. 2015.
- [128] Z. A. Chen, L. Fischer, J. Cox, and J. Rappsilber, “Quantitative Cross-linking/Mass Spectrometry Using Isotope-labeled Cross-linkers and MaxQuant,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 15, no. 8, pp. 2769–2778, 2016.
- [129] J. D. Chavez *et al.*, “Quantitative interactome analysis reveals a chemoresistant

- edgotype.," *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 7928, 2015.
- [130] R. Zhang, C. S. Sioma, S. Wang, and F. E. Regnier, "Fractionation of isotopically labeled peptides in quantitative proteomics," *Anal. Chem.*, vol. 73, no. 21, pp. 5142–5149, 2001.
- [131] M. Hashimoto and Y. Hatanaka, "Simple Synthesis of Deuterium and ¹³C Labeled Trifluoromethyl Phenyl diazirine Derivatives as Stable Isotope Tags for Mass Spectrometry," *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, vol. 52, no. 11, pp. 1385–1386, 2004.
- [132] J. Pettelkau, C. H. Ihling, P. Froberg, L. van Werven, O. Jahn, and A. Sinz, "Reliable Identification of Cross-Linked Products in Protein Interaction Studies by ¹³C-Labeled p-Benzoylphenylalanine," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 25, no. 9, pp. 1628–1641, Sep. 2014.
- [133] C. J. Collins, B. Schilling, M. Young, G. Dollinger, and R. K. Guy, "Isotopically labeled crosslinking reagents: resolution of mass degeneracy in the identification of crosslinked peptides," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 13, no. 22, pp. 4023–4026, Nov. 2003.
- [134] E. C. Yi *et al.*, "Increased quantitative proteome coverage with ¹³C/ ¹²C-based, acid-cleavable isotope-coded affinity tag reagent and modified data acquisition scheme," *Proteomics*, vol. 5, no. 2, pp. 380–387, 2005.
- [135] F. Lottspeich and J. Kellermann, "ICPL Labeling Strategies for Proteome Research," vol. 753, 2011, pp. 55–64.
- [136] B. X. Huang, H.-Y. Kim, and C. Dass, "Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 15, no. 8, pp. 1237–1247, Aug. 2004.
- [137] F. Chu, S. Mahrus, C. S. Craik, and A. L. Burlingame, "Isotope-Coded and Affinity-Tagged Cross-Linking (ICATXL): An Efficient Strategy to Probe Protein Interaction Surfaces," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 32, pp. 10362–10363, Aug. 2006.
- [138] F. J. Flett, T. Sachsenberg, O. Kohlbacher, C. L. Mackay, and H. Interthal, "Differential Enzymatic ¹⁶O/ ¹⁸O Labeling for the Detection of Cross-Linked Nucleic Acid-Protein Heteroconjugates," *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 21, pp. 11208–11213, 2017.
- [139] C. Arlt, C. H. Ihling, and A. Sinz, "Structure of full-length p53 tumor suppressor probed by chemical cross-linking and mass spectrometry," *Proteomics*, vol. 15, no. 16, pp. 2746–2755, 2015.
- [140] C. Arlt, V. Flegler, C. H. Ihling, M. Schi \ddot{u} fer, I. Thondorf, and A. Sinz, "An Integrated Mass Spectrometry Based Approach to Probe the Structure of the Full-Length Wild-Type Tetrameric p53 Tumor Suppressor," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 56, no. 1, pp. 275–279, 2017.
- [141] D. Rozbeský, M. Rosůlek, Z. Kukačka, J. Chmelík, P. Man, and P. Novák, "Impact of Chemical Cross-Linking on Protein Structure and Function," *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 2, pp. 1104–1113, 2018.
- [142] J. H. Beynon, "Qualitative Analysis of Organic Compounds by Mass Spectrometry," *Nature*, vol. 174, no. 4433, pp. 735–737, Oct. 1954.
- [143] S. Kim, R. P. Rodgers, and A. G. Marshall, "Truly 'exact' mass: Elemental composition can be determined uniquely from molecular mass measurement at ~0.1 mDa accuracy for molecules up to ~500 Da," *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 251, no. 2–3, pp. 260–265, Apr. 2006.
- [144] S. G. Valeja, N. K. Kaiser, F. Xian, C. L. Hendrickson, J. C. Rouse, and A. G. Marshall,

- “Unit Mass Baseline Resolution for an Intact 148 kDa Therapeutic Monoclonal Antibody by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry,” *Anal. Chem.*, vol. 83, no. 22, pp. 8391–8395, Nov. 2011.
- [145] L. Sleno, “The use of mass defect in modern mass spectrometry,” *J. Mass Spectrom.*, vol. 47, no. 2, pp. 226–236, Feb. 2012.
- [146] E. Kendrick, “A Mass Scale Based on $\text{CH}_2 = 14.0000$ for High Resolution Mass Spectrometry of Organic Compounds,” *Anal. Chem.*, vol. 35, no. 13, pp. 2146–2154, 1963.
- [147] X. Yao, P. Diego, A. A. Ramos, and Y. Shi, “Averagine-Scaling Analysis and Fragment Ion Mass Defect Labeling in Peptide Mass Spectrometry,” *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 19, pp. 7383–7391, Oct. 2008.
- [148] J. Yergey, D. Heller, G. Hansen, R. J. Cotter, and C. Fenselau, “Isotopic distributions in mass spectra of large molecules,” *Anal. Chem.*, vol. 55, no. 2, pp. 353–356, Feb. 1983.
- [149] R. A. Zubarev and P. V. Bonddarenko, “An A priori relationship between the average and monoisotopic masses of peptides and oligonucleotides,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 5, no. 6, pp. 276–277, Jun. 1991.
- [150] A. G. Marshall *et al.*, “Protein Molecular Mass to 1 Da by ^{13}C , ^{15}N Double-Depletion and FT-ICR Mass Spectrometry,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, no. 2, pp. 433–434, Jan. 1997.
- [151] E. M. Thurman and I. Ferrer, “The isotopic mass defect: a tool for limiting molecular formulas by accurate mass,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 397, no. 7, pp. 2807–2816, Aug. 2010.
- [152] M. W. Senko, S. C. Beu, and F. W. McLafferty, “Determination of monoisotopic masses and ion populations for large biomolecules from resolved isotopic distributions,” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 6, no. 4, pp. 229–233, Apr. 1995.
- [153] S. D.-H. Shi, C. L. Hendrickson, and A. G. Marshall, “Counting individual sulfur atoms in a protein by ultrahigh-resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: Experimental resolution of isotopic fine structure in proteins,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 95, no. 20, pp. 11532–11537, Sep. 1998.
- [154] A. E. Merrill *et al.*, “NeuCode Labels for Relative Protein Quantification,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 13, no. 9, pp. 2503–2512, Sep. 2014.
- [155] M. Mann, “Useful Tables of Possible and Probable Peptide Masses,” in *Proceedings of the 43rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics.*, 1995, p. 639.
- [156] K. A. Artemenko, A. R. Zubarev, T. Y. Samgina, A. T. Lebedev, M. M. Savitski, and R. A. Zubarev, “Two Dimensional Mass Mapping as a General Method of Data Representation in Comprehensive Analysis of Complex Molecular Mixtures,” *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 10, pp. 3738–3745, May 2009.
- [157] B. Spengler, “De novo sequencing, peptide composition analysis, and composition-based sequencing: A new strategy employing accurate mass determination by fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry,” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 15, no. 5, pp. 703–714, 2004.
- [158] A. V. Nefedov, I. Mitra, A. R. Brasier, and R. G. Sadygov, “Examining troughs in the mass distribution of all theoretically possible tryptic peptides,” *J. Proteome Res.*, vol. 10, no. 9, pp. 4150–4157, Sep. 2011.

- [159] E. D. Dodds, H. J. An, P. J. Hagerman, and C. B. Lebrilla, "Enhanced peptide mass fingerprinting through high mass accuracy: Exclusion of non-peptide signals based on residual mass," *J. Proteome Res.*, vol. 5, no. 5, pp. 1195–1203, 2006.
- [160] W. D. Lehmann, A. Bohne, and C.-W. von der Lieth, "The information encrypted in accurate peptide masses? improved protein identification and assistance in glycopeptide identification and characterization," *J. Mass Spectrom.*, vol. 35, no. 11, pp. 1335–1341, Nov. 2000.
- [161] M. Wehofsky, R. Hoffmann, M. Hubert, and B. Spengler, "Isotopic Deconvolution of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectra for Substance-Class Specific Analysis of Complex Samples," *Eur. J. Mass Spectrom.*, vol. 7, no. 1, pp. 39–46, Feb. 2001.
- [162] B. Spengler and A. Hester, "Mass-Based Classification (MBC) of Peptides: Highly Accurate Precursor Ion Mass Values Can Be Used to Directly Recognize Peptide Phosphorylation," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 19, no. 12, pp. 1808–1812, 2008.
- [163] Y. Mao, L. Zamdborg, N. L. Kelleher, C. L. Hendrickson, and A. G. Marshall, "Identification of phosphorylated human peptides by accurate mass measurement alone," *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 308, no. 2–3, pp. 357–361, Dec. 2011.
- [164] M. Kalita, T. Kasumov, A. R. Brasier, and R. G. Sadygov, "Use of Theoretical Peptide Distributions in Phosphoproteome Analysis," *J. Proteome Res.*, vol. 12, no. 7, pp. 3207–3214, Jul. 2013.
- [165] B. Spengler and A. Hester, "Mass-Based Classification (MBC) of Peptides: Highly Accurate Precursor Ion Mass Values Can Be Used to Directly Recognize Peptide Phosphorylation," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 19, no. 12, pp. 1808–1812, Dec. 2008.
- [166] H. Steen and M. Mann, "Analysis of Bromotryptophan and Hydroxyproline Modifications by High-Resolution, High-Accuracy Precursor Ion Scanning Utilizing Fragment Ions with Mass-Deficient Mass Tags," *Anal. Chem.*, vol. 74, no. 24, pp. 6230–6236, Dec. 2002.
- [167] Y. Shi, B. Bajrami, M. Morton, and X. Yao, "Cyclophosphoramidate Ion as Mass Defect Marker for Efficient Detection of Protein Serine Phosphorylation," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 19, pp. 7614–7623, Oct. 2008.
- [168] M. P. Hall and L. V. Schneider, "Isotope-differentiated binding energy shift tags (IDBESTTM) for improved targeted biomarker discovery and validation," *Expert Rev. Proteomics*, vol. 1, no. 4, pp. 421–431, 2004.
- [169] H. Hernandez, S. Niehauser, S. A. Boltz, V. Gawandi, R. S. Phillips, and I. J. Amster, "Mass defect labeling of cysteine for improving peptide assignment in shotgun proteomic analyses," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 10, pp. 3417–3423, May 2006.
- [170] J.-S. Kim, J. Kim, J. M. Oh, and H.-J. Kim, "Tandem mass spectrometric method for definitive localization of phosphorylation sites using bromine signature," *Anal. Biochem.*, vol. 414, no. 2, pp. 294–296, Jul. 2011.
- [171] J. S. Kim, S. U. Song, and H. J. Kim, "Simultaneous identification of tyrosine phosphorylation and sulfation sites utilizing tyrosine-specific bromination," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 22, no. 11, pp. 1916–1925, 2011.
- [172] M. Miyagi, M. Nakao, T. Nakazawa, I. Kato, and S. Tsunasawa, "A novel derivatization method with 5-bromonicotinic acid N-hydroxysuccinimide for determination of the amino acid sequences of peptides," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 12, no. 10,

- pp. 603–608, 1998.
- [173] J. S. Kim, M. Shin, J. S. Song, S. An, and H. J. Kim, “C-terminal de novo sequencing of peptides using oxazolone-based derivatization with bromine signature,” *Anal. Biochem.*, vol. 419, no. 2, pp. 211–216, 2011.
- [174] J. Nam *et al.*, “Bromine isotopic signature facilitates de novo sequencing of peptides in free-radical-initiated peptide sequencing (FRIPS) mass spectrometry,” *J. Mass Spectrom.*, vol. 50, no. 2, pp. 378–387, Feb. 2015.
- [175] F. Liu, D. T. S. Rijkers, H. Post, and A. J. R. Heck, “Proteome-wide profiling of protein assemblies by cross-linking mass spectrometry,” *Nat. Methods*, no. september, pp. 1–9, 2015.
- [176] O. Klykov, B. Steigenberger, S. Pektaş, D. Fasci, A. J. R. Heck, and R. A. Scheltema, “Efficient and robust proteome-wide approaches for cross-linking mass spectrometry,” *Nat. Protoc.*, vol. 13, no. 12, pp. 2964–2990, Dec. 2018.
- [177] C. Arlt, M. Götze, C. H. Ihling, C. Hage, M. Schäfer, and A. Sinz, “Integrated Workflow for Structural Proteomics Studies Based on Cross-Linking/Mass Spectrometry with an MS/MS Cleavable Cross-Linker,” *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 16, pp. 7930–7937, Aug. 2016.
- [178] C. E. Stieger, P. Doppler, and K. Mechtler, “Optimized Fragmentation Improves the Identification of Peptides Cross-Linked by MS-Cleavable Reagents,” *J. Proteome Res.*, vol. 18, no. 3, pp. 1363–1370, Mar. 2019.
- [179] M. Götze, J. Pettelkau, R. Fritzsche, C. H. Ihling, M. Schäfer, and A. Sinz, “Automated Assignment of MS/MS Cleavable Cross-Links in Protein 3D-Structure Analysis,” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 26, no. 1, pp. 83–97, Jan. 2015.
- [180] M. Q. Müller, F. Dreiocker, C. H. Ihling, M. Schäfer, and A. Sinz, “Cleavable cross-linker for protein structure analysis: Reliable identification of cross-linking products by tandem MS,” *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 16, pp. 6958–6968, 2010.
- [181] M. W. Gardner and J. S. Brodbelt, “Preferential cleavage of N-N hydrazone bonds for sequencing bis-arylhydrazone conjugated peptides by electron transfer dissociation,” *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 13, pp. 5751–5759, 2010.
- [182] M. J. Trnka and A. L. Burlingame, “Topographic Studies of the GroEL-GroES Chaperonin Complex by Chemical Cross-linking Using Diformyl Ethynylbenzene,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 9, no. 10, pp. 2306–2317, 2010.
- [183] J. K. Chakrabarty, A. G. Naik, M. B. Fessler, G. R. Munske, and S. M. Chowdhury, “Differential Tandem Mass Spectrometry-Based Cross-Linker: A New Approach for High Confidence in Identifying Protein Cross-Linking,” *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 20, pp. 10215–10222, 2016.
- [184] R. Wang *et al.*, “Traceless Cross-Linker for Photocleavable Bioconjugation,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 23, no. 4, pp. 705–713, Apr. 2012.
- [185] D. Tan *et al.*, “Trifunctional cross-linker for mapping protein-protein interaction networks and comparing protein conformational states,” *Elife*, vol. 5, no. MARCH2016, pp. 1–52, Mar. 2016.
- [186] R. Hodyss, H. a. Cox, and J. L. Beauchamp, “Bioconjugates for Tunable Peptide Fragmentation: Free Radical Initiated Peptide Sequencing (FRIPS),” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 36, pp. 12436–12437, Sep. 2005.
- [187] C. Iacobucci, M. Schäfer, and A. Sinz, “Free radical-initiated peptide sequencing

- (FRIPS)-based cross-linkers for improved peptide and protein structure analysis,” *Mass Spectrom. Rev.*, no. November 2017, pp. 1–15, 2018.
- [188] E. J. Soderblom, B. G. Bobay, J. Cavanagh, and M. B. Goshe, “Tandem mass spectrometry acquisition approaches to enhance identification of protein-protein interactions using low-energy collision-induced dissociative chemical crosslinking reagents,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 21, no. 21, pp. 3395–3408, Nov. 2007.
- [189] Y. Huang *et al.*, “Statistical Characterization of the Charge State and Residue Dependence of Low-Energy CID Peptide Dissociation Patterns,” *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 18, pp. 5800–5813, Sep. 2005.
- [190] E. J. Soderblom and M. B. Goshe, “Collision-Induced Dissociative Chemical Cross-Linking Reagents and Methodology: Applications to Protein Structural Characterization Using Tandem Mass Spectrometry Analysis,” *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 23, pp. 8059–8068, Dec. 2006.
- [191] F. Dreiocker, M. Q. Müller, A. Sinz, and M. Schäfer, “Collision-induced dissociative chemical cross-linking reagent for protein structure characterization: Applied Edman chemistry in the gas phase,” *J. Mass Spectrom.*, vol. 45, no. 2, pp. 178–189, Feb. 2010.
- [192] P. Edman, “Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides,” *Acta Chem. Scand.*, vol. 4, pp. 283–293, 1950.
- [193] S. G. Summerfield, M. S. Bolgar, and S. J. Gaskell, “Promotion and stabilization of bIons in peptide phenylthiocarbamoyl derivatives: Analogies with condensed-phase chemistry,” *J. Mass Spectrom.*, vol. 32, no. 2, pp. 225–231, 1997.
- [194] S. G. Summerfield, H. Steen, M. O’Malley, and S. J. Gaskell, “Phenyl thiocarbamoyl and related derivatives of peptides: Edman chemistry in the gas phase,” *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 188, no. 1–2, pp. 95–103, May 1999.
- [195] M. Müller, “Massenspektrometrische Untersuchungen an Peroxisom-Proliferator-aktiviertem Rezeptor alpha,” 2011.
- [196] M. Q. Müller, J. J. Zeiser, F. Dreiocker, A. Pich, M. Schäfer, and A. Sinz, “A universal matrix-assisted laser desorption/ionization cleavable cross-linker for protein structure analysis,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 25, no. 1, pp. 155–161, Jan. 2011.
- [197] D. Pan, A. Brockmeyer, F. Mueller, A. Musacchio, and T. Bange, “Simplified Protocol for Cross-linking Mass Spectrometry Using the MS-Cleavable Cross-linker DSBU with Efficient Cross-link Identification,” *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 18, pp. 10990–10999, Sep. 2018.
- [198] G. E. Reid, S. E. Tichy, J. Pérez, R. A. J. O’Hair, R. J. Simpson, and H. I. Kenttämaa, “N-Terminal Derivatization and Fragmentation of Neutral Peptides via Ion–Molecule Reactions with Acylium Ions: Toward Gas-Phase Edman Degradation?,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, no. 6, pp. 1184–1192, Feb. 2001.
- [199] D. M. Good, M. Wirtala, G. C. McAlister, and J. J. Coon, “Performance characteristics of electron transfer dissociation mass spectrometry,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 6, no. 11, pp. 1942–1951, 2007.
- [200] N. P. Sargaeva, C. Lin, and P. B. O’Connor, “Identification of Aspartic and Isoaspartic Acid Residues in Amyloid β Peptides, Including A β 1–42, Using Electron–Ion Reactions,” *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 23, pp. 9778–9786, Dec. 2009.
- [201] R. A. Zubarev, “Reactions of polypeptide ions with electrons in the gas phase,” *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 22, no. 1, pp. 57–77, 2003.

- [202] K. O. Zhurov *et al.*, “Principles of electron capture and transfer dissociation mass spectrometry applied to peptide and protein structure analysis,” *Chem. Soc. Rev. Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 42, pp. 5014–5030, 2013.
- [203] J. E. P. Syka, J. J. Coon, M. J. Schroeder, J. Shabanowitz, and D. F. Hunt, “Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, no. 26, pp. 9528–9533, Jun. 2004.
- [204] R. A. Zubarev *et al.*, “Electron Capture Dissociation for Structural Characterization of Multiply Charged Protein Cations,” *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 3, pp. 563–573, Feb. 2000.
- [205] H. J. Cooper, K. Håkansson, and A. G. Marshall, “The role of electron capture dissociation in biomolecular analysis,” *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 24, no. 2, pp. 201–222, Mar. 2005.
- [206] G. C. McAlister *et al.*, “A Proteomics Grade Electron Transfer Dissociation-Enabled Hybrid Linear Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometer,” *J. Proteome Res.*, vol. 7, no. 8, pp. 3127–3136, Aug. 2008.
- [207] D. L. Swaney, G. C. McAlister, and J. J. Coon, “Decision tree-driven tandem mass spectrometry for shotgun proteomics,” *Nat. Methods*, vol. 5, no. 11, pp. 959–964, Nov. 2008.
- [208] Q. Yu *et al.*, “Electron-Transfer/Higher-Energy Collision Dissociation (ETHcD)-Enabled Intact Glycopeptide/Glycoproteome Characterization,” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 28, no. 9, pp. 1751–1764, 2017.
- [209] L. Kolbowski, M. L. Mendes, and J. Rappsilber, “Optimizing the Parameters Governing the Fragmentation of Cross-Linked Peptides in a Tribrid Mass Spectrometer,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 10, pp. 5311–5318, 2017.
- [210] D. S. Masterson, H. Yin, A. Chacon, D. L. Hachey, J. L. Norris, and N. A. Porter, “Lysine Peroxycarbamates: Free Radical-Promoted Peptide Cleavage,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 3, pp. 720–721, 2004.
- [211] I. K. Chu, C. F. Rodriguez, T.-C. Lau, A. C. Hopkinson, and K. W. M. Siu, “Molecular Radical Cations of Oligopeptides,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 104, no. 15, pp. 3393–3397, Apr. 2000.
- [212] C. K. Barlow, W. D. McFadyen, and R. A. J. O’Hair, “Formation of Cationic Peptide Radicals by Gas-Phase Redox Reactions with Trivalent Chromium, Manganese, Iron, and Cobalt Complexes,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 16, pp. 6109–6115, Apr. 2005.
- [213] H. A. Headlam, A. Mortimer, C. J. Easton, and M. J. Davies, “ β -Scission of C-3 (β -Carbon) Alkoxy Radicals on Peptides and Proteins: A Novel Pathway Which Results in the Formation of α -Carbon Radicals and the Loss of Amino Acid Side Chains,” *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 13, no. 11, pp. 1087–1095, Nov. 2000.
- [214] S. Wee *et al.*, “Gas-phase regiocontrolled generation of charged amino acid and peptide radicals,” *Chem. Commun.*, no. 40, pp. 4233–4235, 2006.
- [215] A. K. Y. Lam, V. Ryzhov, and R. A. J. O’Hair, “Mobile protons versus mobile radicals: Gas-phase unimolecular chemistry of radical cations of cysteine-containing peptides,” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 21, no. 8, pp. 1296–1312, 2010.
- [216] C. H. Sohn, “New reagents and methods for mass spectrometry-based proteomics investigations,” California Institute of Technology, 2011.
- [217] M. Lee, M. Kang, B. Moon, and H. Bin Oh, “Gas-phase peptide sequencing by

- TEMPO-mediated radical generation,” *Analyst*, vol. 134, no. 8, pp. 1706–1712, 2009.
- [218] M. Lee *et al.*, “Disulfide bond cleavage in TEMPO-free radical initiated peptide sequencing mass spectrometry,” *J. Mass Spectrom.*, vol. 46, no. 8, pp. 830–839, Aug. 2011.
- [219] J. K. Diedrich and R. R. Julian, “Facile identification of phosphorylation sites in peptides by radical directed dissociation,” *Anal. Chem.*, vol. 83, no. 17, pp. 6818–6826, 2011.
- [220] J. K. Diedrich and R. R. Julian, “Site-selective fragmentation of peptides and proteins at quinone-modified cysteine residues investigated by ESI-MS,” *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 10, pp. 4006–4014, 2010.
- [221] N. B. Borotto, K. M. Ileka, C. A. T. M. B. Tom, B. R. Martin, and K. Håkansson, “Free Radical Initiated Peptide Sequencing for Direct Site Localization of Sulfation and Phosphorylation with Negative Ion Mode Mass Spectrometry,” *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 16, pp. 9682–9686, Aug. 2018.
- [222] F. Falvo, L. Fiebig, and M. Schäfer, “Presentation of a homobifunctional azo-reagent for protein structure analysis by collision-induced dissociative chemical cross-linking: Proof-of-principle in memory of Detlef Schröder,” *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 354–355, pp. 26–32, Nov. 2013.
- [223] C. Iacobucci, C. Hage, M. Schäfer, and A. Sinz, “A Novel MS-Cleavable Azo Cross-Linker for Peptide Structure Analysis by Free Radical Initiated Peptide Sequencing (FRIPS),” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 28, no. 10, pp. 2039–2053, 2017.
- [224] C. Ihling, F. Falvo, I. Kratochvil, A. Sinz, and M. Schäfer, “Dissociation behavior of a bifunctional tempo-active ester reagent for peptide structure analysis by free radical initiated peptide sequencing (FRIPS) mass spectrometry,” *J. Mass Spectrom.*, vol. 50, no. 2, pp. 396–406, Feb. 2015.
- [225] H. A. Staab, “Synthese, Eigenschaften und präparative Verwendung von N,N'-Carbonyl-di-imidazol,” *Angew. Chemie*, vol. 68, no. 23, pp. 754–754, Dec. 1956.
- [226] H. A. Staab, H. Bauer, and K. M. Schneider, *Azolides in Organic Synthesis and Biochemistry*. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1998.
- [227] H. A. Staab and W. Benz, “Reaktionsfähige heterocyclische Amide der Kohlensäure, VI. Synthese und Eigenschaften von N-Carbonsäureamiden der Azole Eine neue Isocyanat-Synthese,” *Justus Liebigs Ann. Chem.*, vol. 648, no. 1, pp. 72–82, Dec. 1961.
- [228] K. J. Padiya *et al.*, “Unprecedented ‘In Water’ Imidazole Carbonylation: Paradigm Shift for Preparation of Urea and Carbamate,” *Org. Lett.*, vol. 14, no. 11, pp. 2814–2817, Jun. 2012.
- [229] C. Hage, C. Iacobucci, A. Rehkamp, C. Arlt, and A. Sinz, “The First Zero-Length Mass Spectrometry-Cleavable Cross-Linker for Protein Structure Analysis,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 56, no. 46, pp. 14551–14555, Nov. 2017.
- [230] “Creative Molecules Inc.” [Online]. Available: <http://www.creativemolecules.com/>.
- [231] F. Falvo, *Synthese und Anwendung neuer CID-labiler Cross-Linker zur tandem-MS Strukturanalyse von Proteinen*, 1. Aufl. München: Verl. Dr. Hut, 2015.
- [232] J. M. Lowenstein, “Carbamoylglyoxaline,” *J. Chem. Soc.*, vol. 39, no. 5, p. 4667, 1956.
- [233] ExpASY and Bioinformatic Resource Portal, “Compute pI/Mw Tool.” [Online]. Available: https://web.expasy.org/compute_pi/.

- [234] Innovagen AB, "PepCalc.com - Peptide property calculator." [Online]. Available: <https://pepcalc.com/>.
- [235] J. Rappsilber, Y. Ishihama, and M. Mann, "Stop and Go Extraction Tips for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Nanoelectrospray, and LC/MS Sample Pretreatment in Proteomics," *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 3, pp. 663–670, Feb. 2003.
- [236] U. K. LAEMMLI, "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, Aug. 1970.
- [237] C. Iacobucci, C. Piotrowski, A. Rehkamp, C. H. Ihling, and A. Sinz, "The First MS-Cleavable, Photo-Thiol-Reactive Cross-Linker for Protein Structural Studies," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 30, no. 1, pp. 139–148, Jan. 2019.
- [238] "CF Plus Chemicals, Protein crosslinkers." [Online]. Available: <https://www.cfplus.cz/protein-crosslinkers/>.
- [239] M. Bergmann and L. Zervas, "Zur Kenntnis des Histidins. Peptidbildung durch Acylwanderung. (23. Mitteilung über Umlagerung peptidähnlicher Stoffe.)," *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiol. Chemie*, vol. 175, no. 3–4, pp. 145–153, Jan. 1928.
- [240] H. A. Staab, "Transacylierungen I.N-Acyl-Verbindungen stickstoffhaltiger Heterocyclen," *Chem. Ber.*, vol. 89, no. 8, pp. 1927–1940, Aug. 1956.
- [241] H. A. Staab, "Reaktionsfähige Heterocyclische Diamide Der Kohlensäure," *Justus Liebigs Ann. Chem.*, vol. 609, no. 1, pp. 75–83, Oct. 1957.
- [242] C. Iacobucci *et al.*, "First Community-Wide, Comparative Cross-Linking Mass Spectrometry Study," *Analytical Chemistry*, vol. 91, no. 11. 2019.
- [243] M. Thompson, "ArgusLab." [Online]. Available: <http://www.arguslab.com/arguslab.com/ArgusLab.html>.
- [244] C. Iacobucci *et al.*, "Carboxyl-Photo-Reactive MS-Cleavable Cross-Linkers: Unveiling a Hidden Aspect of Diazirine-Based Reagents," *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 4, pp. 2805–2809, Feb. 2018.
- [245] H. Tidow *et al.*, "Quaternary structures of tumor suppressor p53 and a specific p53 DNA complex," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 30, pp. 12324–12329, Jul. 2007.
- [246] A. L. Okorokov *et al.*, "The structure of p53 tumour suppressor protein reveals the basis for its functional plasticity," *EMBO J.*, vol. 25, no. 21, pp. 5191–5200, Nov. 2006.
- [247] R. Aramayo, M. B. Sherman, K. Brownless, R. Lurz, A. L. Okorokov, and E. V. Orlova, "Quaternary structure of the specific p53–DNA complex reveals the mechanism of p53 mutant dominance," *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. 20, pp. 8960–8971, Nov. 2011.
- [248] A. Di Ianni *et al.*, "Structural assessment of the full-length wild-type tumor suppressor protein p53 by mass spectrometry-guided computational modeling," *Sci. Rep.*, vol. 13, no. 1, p. 8497, May 2023.
- [249] J. Pettelkau *et al.*, "Structural Insights into retinal guanylylcyclase-GCAP-2 interaction determined by cross-linking and mass spectrometry.," *Biochemistry*, vol. 51, no. 24, pp. 4932–4949, Jun. 2012.
- [250] J. Pettelkau *et al.*, "Structural analysis of guanylyl cyclase-activating protein-2 (GCAP-2) homodimer by stable isotope-labeling, chemical cross-linking, and mass spectrometry.," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 24, no. 12, pp. 1969–1979, Dec. 2013.
- [251] J. B. Ames, A. M. Dizhoor, M. Ikura, K. Palczewski, and L. Stryer, "Three-dimensional structure of guanylyl cyclase activating protein-2, a calcium-sensitive modulator of

- photoreceptor guanylyl cyclases.," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 27, pp. 19329–19337, Jul. 1999.
- [252] J. Lee *et al.*, "One-step peptide backbone dissociations in negative-ion free radical initiated peptide sequencing mass spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 15, pp. 7044–7051, Aug. 2013.
- [253] C. Hage, F. Falvo, M. Schäfer, and A. Sinz, "Novel Concepts of MS-Cleavable Cross-linkers for Improved Peptide Structure Analysis," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 28, no. 10, pp. 2022–2038, Oct. 2017.
- [254] C. Hage, C. H. Ihling, M. Götz, M. Schäfer, and A. Sinz, "Dissociation Behavior of a TEMPO-Active Ester Cross-Linker for Peptide Structure Analysis by Free Radical Initiated Peptide Sequencing (FRIPS) in Negative ESI-MS," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 28, no. 1, pp. 56–68, 2017.
- [255] O. Ozohanics, X. Zhang, N. S. Nemeria, A. Ambrus, and F. Jordan, "Probing the E1o-E2o and E1a-E2o Interactions in Binary Subcomplexes of the Human 2-Oxoglutarate Dehydrogenase and 2-Oxoadipate Dehydrogenase Complexes by Chemical Cross-Linking Mass Spectrometry and Molecular Dynamics Simulation," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 5, p. 4555, Feb. 2023.
- [256] C. Hage and A. Sinz, "Ein „altes“ Reagenz neu entdeckt," *GIT Labor- Fachzeitschrift*, vol. 62, no. 4, pp. 32–34, 2018.
- [257] K. Gaspar, K. Fabijanczuk, T. Otegui, J. Acosta, and J. Gao, "Development of Novel Free Radical Initiated Peptide Sequencing Reagent: Application to Identification and Characterization of Peptides by Mass Spectrometry," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 30, no. 3, pp. 548–556, Mar. 2019.
- [258] K. E. Osho, K. A. Wasik, L. M. Geary, and N. B. Borotto, "Improved Performance of Positive-Ion Mode Free Radical-Initiated Peptide Sequencing with p-TEMPO-Bz," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 34, no. 4, pp. 579–585, 2023.
- [259] A. V. Nefedov, I. Mitra, A. R. Brasier, and R. G. Sadygov, "Examining troughs in the mass distribution of all theoretically possible tryptic peptides," *J. Proteome Res.*, vol. 10, no. 9, pp. 4150–4157, 2011.
- [260] E. V. Petrotchenko, J. J. Serpa, and C. H. Borchers, "An Isotopically Coded CID-cleavable Biotinylated Cross-linker for Structural Proteomics," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 10, no. 2, p. M110.001420, Feb. 2011.
- [261] A. Kao *et al.*, "Development of a Novel Cross-linking Strategy for Fast and Accurate Identification of Cross-linked Peptides of Protein Complexes," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 10, no. 1, p. M110.002212, Jan. 2011.
- [262] Y. Lu, M. Tanasova, B. Borhan, and G. E. Reid, "Ionic Reagent for Controlling the Gas-Phase Fragmentation Reactions of Cross-Linked Peptides," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 23, pp. 9279–9287, Dec. 2008.
- [263] B. Clifford-Nunn, H. D. H. Showalter, and P. C. Andrews, "Quaternary diamines as mass spectrometry cleavable crosslinkers for protein interactions," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 23, no. 2, pp. 201–212, 2012.
- [264] A. M. Burke *et al.*, "Synthesis of two new enrichable and MS-cleavable cross-linkers to define protein–protein interactions by mass spectrometry," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 13, no. 17, pp. 5030–5037, 2015.
- [265] S. E. Hagen, K. Liu, Y. Jin, L. Piersimoni, P. C. Andrews, and H. D. Showalter,

“Synthesis of CID-cleavable protein crosslinking agents containing quaternary amines for structural mass spectrometry,” *Org. Biomol. Chem.*, vol. 16, no. 37, pp. 6867–6870, 2018.

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und im Besonderen Frau Professor Andrea Sinz. Bei meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe von Professor Sinz möchte ich mich für die immer gute und konstruktive Arbeitsatmosphäre bedanken. Hier möchte ich besonders Dr. Christian Ihling, Dirk Tänzler, Martina Mannd und Antje Peters danken, mit denen ich sowohl im Labor als auch im Rahmen der Praktikumsbetreuung zusammenarbeiten durfte. Besonders danken möchte ich zudem Dr. Michael Götze für die begleitende Entwicklung der MeroX-Software und deren Anpassung im Laufe meiner Promotionszeit. Auch Dr. Claudio Iacobucci möchte ich herzlich für die hervorragende Zusammenarbeit in den von uns gemeinsam bearbeiteten Projekten und die ergiebigen Diskussionen über chemische Synthesemethoden, Gasphasenchemie und Datenauswertung danken. Frau Dr. Christine Piotrowski gebührt in diesem Zusammenhang sowohl Dank für Ihre fachlichen Beiträge als auch für die schöne Zeit im Büro – wo die meisten dieser Diskussionen oft angeregt stattfanden. Das freundschaftliche Miteinander war und ist eine Bereicherung, die ich nicht missen möchte. Frau Dr. Lisa Lampp und Dr. Adina Eichner danke ich außerdem für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Nicht unerwähnt lassen möchte ich Dr. Francesco Falvo, der im Arbeitskreis von Herrn Prof. Mathias Schäfer (Universität zu Köln) die Synthese des BuUrBu-Linkers und des Tempo-Bz- und BrPU-Linkers durchführte. Für die Bereitstellung der gereinigten Substanzen gebührt ihm besonderer Dank.

Meiner Familie danke ich für die immerwährende Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir gibt. Ohne sie wäre mein bisheriger Lebensweg so nicht möglich gewesen. Auch dir Lisa danke ich vielmals für deine liebevolle Unterstützung.

12 Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Dissertationsschrift wurde gemäß der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde ausschließlich der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt und an keiner anderen universitären Einrichtung, weder im In- noch im Ausland, zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht.

Datum, Ort

Christoph Hage

13 Lebenslauf

Lebenslauf

| | |
|-------------------|--|
| Seit 01/2023 | Mitarbeiter im Weingut Dr. Hage (Freyburg/U.) |
| 02/2020 – 12/2022 | Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Angewandte Dermatopharmazie e.V., Weinbergweg 23, 06120 Halle(Saale) |
| 02/2019 - 01/2020 | Mitarbeiter im Weingut Dr. Hage (Freyburg/U.) |
| 02/2015 - 01/2019 | Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Promotionsstudent) an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik, Arbeitskreis von Prof. A. Sinz Thema der Dissertation: „Entwicklung spaltbarer Quervernetzungsreagenzien für die Peptid- und Proteinstrukturanalytik“ (Betreuer: Professor A. Sinz) Lehraufgaben: Praktikum „Instrumentelle Analytik“ |
| 01/2014 – 06/2014 | Erstellung der Masterarbeit an der Universität Antwerpen in der BAMS-Gruppe von Prof. F. Sobott (Betreuer an der TU Dresden: Prof. E. Brunner, TU Dresden) Thema: „Charakterisierung nativer Proteinzustände mittels Massenspektrometrie“ |
| 09/2013 – 12/2013 | Forschungspraktikum an der Universität Antwerpen in der BAMS-Gruppe von Prof. F. Sobott (und Prof. E. Brunner, TU Dresden) Thema: „Ionenmobilitäts- und massenspektrometrische Studien des Aggregationsverhaltens von ABeta40- Amyloiden“ |
| 03/2013 – 08/2013 | Erasmus- Placement an der Universität Antwerpen in der BAMS- Gruppe von Prof. F. Sobott |
| 10/2010 – 09/2014 | Masterstudiengang Chemie an der TU Dresden mit Masterabschluss (Note 1,6) |
| 10/2008 – 09/2010 | Wechsel in den Bachelorstudiengang Chemie an der TU Dresden Thema der Bachelorarbeit: „Potenzialabhängige Fluoreszenzeigenschaften von CdSe- Nanopartikeln auf ITO- Substraten“ |
| 10/2007 – 09/2008 | Immatrikulation in den Bachelorstudiengang Physik an der TU Dresden |
| 2006 | Zivildienst an der geriatrischen Rehabilitationsklinik Dresden-Löbtau |
| 2000 - 2005 | Abitur an der Landesschule Pforta, 06628 Naumburg |

14 Publikationen und Tagungsbeiträge

Wissenschaftliche Veröffentlichungen:

2020:

Christian H. Ihling, Patrizia Springorum, Claudio Iacobucci, Christoph Hage, Michael Götze, Mathias Schäfer, Andrea Sinz: The Isotope-Labeled, MS-Cleavable Cross-Linker Disuccinimidyl Dibutyric Urea (DSBU) for Improved Cross-Linking/Mass Spectrometry Studies. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2020;31(2):183-189

Christoph Hage, Claudio Iacobucci, Michael Götze, Andrea Sinz: A Biuret-Derived, MS-Cleavable Cross-linking Reagent for Protein Structural Analysis: A Proof-of-Principle Study. *J Mass Spectrom*. 2020;55(1):e4445

2018:

Claudio Iacobucci, Michael Götze, Christian H. Ihling, Christine Piotrowski, Christian Arlt, Mathias Schäfer, Christoph Hage, Rico Schmidt, Andrea Sinz: A cross-linking/mass spectrometry workflow based on MS-cleavable cross-linkers and the MeroX software for studying protein structures and protein-protein interactions. *Nat Protoc*. 13, 2864-2889 (2018)

Claudio Iacobucci, Michael Götze, Christine Piotrowski, Christian Arlt, Anne Rehkamp, Christian Ihling, Christoph Hage, Andrea Sinz: Carboxyl-Photo-Reactive MS-Cleavable Cross-Linkers: Unveiling a Hidden Aspect of Diazirine-Based Reagents. *Anal Chem* 90, 2805-2809 (2018)

Christoph Hage und Andrea Sinz: Ein „altes“ Reagenz neu entdeckt: Carbonyldiimidazol als ultrakurzes Vernetzungsreagenz zur verbesserten Proteinstrukturanalyse, *GIT-Labor – Portal für Anwender in Wissenschaft und Industrie*, Wiley Analytical Science, Magazine (2018)

2017:

Christoph Hage, Claudio Iacobucci, Christian Arlt, Anne Rehkamp, Andrea Sinz: The First Zero-Length Mass Spectrometry-Cleavable Cross-Linker for Protein Structure Analysis. *Angew Chem Int Ed Engl* 56:14551-14555 (2017)

Claudio Iacobucci, Christoph Hage, Mathias Schäfer, Andrea Sinz: A Novel MS-Cleavable Azo Cross-Linker for Peptide Structure Analysis by Free Radical Initiated Peptide Sequencing (FRIPS). *J Am Soc Mass Spectrom* 28:2039-2053 (2017)

Christoph Hage, Francesco Falvo; Mathias Schäfer, Andrea Sinz: Novel Concepts of MS-Cleavable Cross-linkers for Improved Peptide Structure Analysis. *J Am Soc Mass Spectrom* 28:2022-2038(2017)

Christoph Hage, Christian H. Ihling, Michael Götze, Mathias Schäfer, Andrea Sinz: Dissociation Behavior of a TEMPO-Active Ester Cross-Linker for Peptide Structure Analysis by Free Radical Initiated Peptide Sequencing (FRIPS) in Negative ESI-MS. *J Am Soc Mass Spectrom*. 28, 56-68 (2017)

2016:

- Christian Arlt, Michael Götze, Christina H. Ihling, Christoph Hage, Mathias Schäfer, Andrea Sinz: Integrated Workflow for Structural Proteomics Studies Based on Cross-Linking/Mass Spectrometry with an MS/MS Cleavable Cross-Linker. *Anal Chem.* 88, 7930-7 (2016)

Tagungsbeiträge (nur Vorträge):2016:

23. Arbeitstagung – Mikromethoden in der Proteinchemie:

„Ein radikal anderer Cross-linker – im positiv negativen Sinne – für die strukturelle Proteomik“ (ausgezeichnet mit dem SERVA-Förderpreis)

6th Symposium on Structural Proteomics, Dortmund:

„Dissociation behavior of a bifunctional TEMPO-benzyl active ester for peptide structure analysis by free-radical-initiated-peptide-sequencing (FRIPS) mass spectrometry in negative ESI-MS”

2017:

50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, Kiel:

“Dissociation Behavior of a TEMPO-Benzyl Cross-Linker for Peptide Structure Analysis by Free Radical Initiated Peptide Sequencing (FRIPS) in Negative ESI-MS”

7th Symposium on Structural Proteomics, Wien:

“The First Zero-Length Mass Spectrometry-Cleavable Cross-Linker for Protein Structure Analysis”

2018:

1st Joint French/German Mass Spectrometry Conference, Saarbrücken:

“The First “Zero-Length” Mass Spectrometry-Cleavable Cross-Linker for Protein Structure Analysis”

Posterbeiträge2015:

Christoph Hage, Annika Butterer, Debbie Dewaele, Frank Sobott

“Influence of Different Buffer Cations on Charge State Distribution and Collisional Cross Sections of Native-Like Protein Ions in Native Mass Spectrometry”

48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Wuppertal, 01- 04. März 2015

Christoph Hage, Andrea Sinz, Mathias Schäfer

“Dissociation behavior of a bifunctional TEMPO-benzyl active ester used for peptide structure analysis by free radical initiated peptide sequencing (FRIPS) mass spectrometry in negative ion mode”

5th Symposium of Structural Proteomics, Halle (Saale), 19-20. November 2015

2016:

Christoph Hage, Mathias Schäfer, Andrea Sinz

“Dissociation behavior of a bifunctional TEMPO-benzyl active ester used for peptide structure analysis by free radical initiated peptide sequencing (FRIPS) mass spectrometry in negative ion mode”

49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Hamburg, 28.Februar- 02.März 2016

Christoph Hage, Mathias Schäfer, Andrea Sinz

“Dissociation behavior of a bifunctional TEMPO-benzyl active ester for peptide structure analysis by free-radical-initiated-peptide-sequencing (FRIPS) mass spectrometry in negative ESI-MS”

6th Symposium on Structural Proteomics 2016, Dortmund, 17 -18. November, ISAS e.V.

2019:

Christoph Hage, Claudio Iacobucci, Andrea Sinz

„A Biuret-derived reagent with urea-like MS-cleavability for cross-linking of proteins“

52. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Rostock, 10-13. März 2019

15 Anhang

| AS | Formel der Seitenkette | Masse Seitenkette [u] | Masse Fragment # [u] | Masse Fragment * [u] | Andere Fragmente [u] | NV | Bz ^o -mod. Fragment # [u] | Bz ^o -mod. Fragment * [u] |
|----|---|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------------|------------------|---|---|
| G | H | 1.0078 | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| A | CH ₃ | 15.0235 | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| S | CH ₂ OH | 31.0184 | 30.0106 | --- | --- | H ₂ O | 148.0524 | 135.0446 |
| P | -CH ₂ CH ₂ CH ₂ - | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| V | CH(CH ₃) ₂ | 43.0548 | 42.0470 | 15.0235 | --- | --- | --- | --- |
| T | CH(OH)CH ₃ | 45.0340 | 44.0262 | --- | 15.0265 (CH ₃) | H ₂ O | 162.0681 | 149.0603 |
| C | CH ₂ SH | 46.9956 | 45.9877 | 32.9799 | --- | H ₂ S | --- | --- |
| I | CH(CH ₃)(C ₂ H ₅) | 57.0704 | 56.0626 | 29.0391 | 15.0265 (CH ₃) | --- | --- | --- |
| L | CH ₂ CH(CH ₃) ₂ | 57.0704 | 56.0626 | 43.0548 | 15.0265 (CH ₃) | --- | --- | --- |
| N | CH ₂ CONH ₂ | 58.0293 | 57.0215 | 44.0136 | --- | --- | --- | --- |
| D | CH ₂ COOH | 59.0133 | 58.0055 | 44.9976 | --- | CO ₂ | --- | --- |
| Q | CH ₂ CH ₂ CONH ₂ | 72.0449 | 71.0371 | 58.0293 | --- | --- | --- | --- |
| K | CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂ | 72.0813 | 71.0735 | 58.0657 | --- | NH ₃ | 189.1154 | 176.1075 |
| E | CH ₂ CH ₂ COOH | 73.0290 | 72.0211 | 59.0133 | --- | CO ₂ | --- | --- |
| M | CH ₂ CH ₂ S(CH ₃) | 75.0269 | 74.0190 | 61.0112 | --- | --- | --- | --- |
| H | CH ₂ (C ₃ H ₃ N ₂) | 81.0453 | 80.0375 | 67.0296 | --- | --- | --- | --- |
| F | CH ₂ (C ₆ H ₅) | 91.0548 | 90.0470 | 77.0391 | --- | --- | --- | --- |
| R | CH ₂ CH ₂ CH ₂ (CH ₄ N ₃) | 100.0875 | 99.0797 | 86.0718 | §: 43.0296 (NH ₂ CNH) | NH ₃ | --- | --- |
| Y | CH ₂ (C ₆ H ₄)(OH) | 107.0497 | 106.0419 | 93.0340 | --- | H ₂ O | 224.0837 | 211.0759 |
| W | CH ₂ (C ₈ H ₆ N) | 130.0657 | 129.0579 | 116.0500 | --- | --- | --- | --- |

Tabelle 16 Übersichtstabelle der theoretischen Massen der Seitenketten- und Neutralverluste der Aminosäuren

AS... Aminosäure, NV... Neutralverlust

| Peptidsequenz (Anzahl der Aminosäuren / pI* / M _{mono}) | Typ 2- Quervernetzungsprodukt |
|---|---|
| H ₂ N-DRVYIHPF-COOH 8 / 6,74 / 1045,53 Da | H ₂ N-DRVYIHPF-COOH H ₂ N-DRVYIHPF-COOH |
| H ₂ N-RPVKVYPNGAEDESA EAFPLEF-COOH 22 / 4,25 / 2464,19 Da | H ₂ N-RPVKVYPNGAEDESA EAFPLEF-COOH H ₂ N-RPVKVYPNGAEDESA EAFPLEF-COOH |
| Ac-TRTESTDIKRASSEADYLINKER-COOH 23 / 7,31** / 2712,43 Da | H ₂ N-TESTDIKR-COOH H ₂ N-EADYLINKER-COOH |
| H ₂ N-TESTDIKR-COOH 8 / 5,74 / 948,49 Da | --- |
| H ₂ N-EADYLINKER-COOH 10 / 4,68 / 1249,63 Da | --- |

Tabelle 17 Modellpeptide und deren Tempo-Bz-Typ 2- Quervernetzungsprodukte

Basische Aminosäuren sind blau, saure Aminosäuren rot dargestellt

* mit ExPASy.com berechnet [233], ** mit Pepcalc.com berechnet [234]

| R ¹ | R ² | Molekülion | | | | CID-MS/MS Fragmentionen | |
|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|---|
| | | [M – H ⁺] ⁻ | [M – 2H ⁺] ²⁻ | [M – 3H ⁺] ³⁻ | [M – 4H ⁺] ⁴⁻ | [R ¹ -Bz – xH ⁺] ^{•x-} | [R ² -TEMPO – xH ⁺] ^{•x-} |
| TESTDIKR | EADYLIN KER | (2496.261) | 1247.627 | 831.416 | 623.310 | 1064.514 | 1430.740 |
| | | | | | | (x=1) | (x=1) |
| | | | | | | 531.753 | 714.867 |
| EADYLIN KER | TESTDIKR | (2496.261) | 1247.627 | 831.416 | 623.310 | (x=2) | (x=2) |
| | | | | | | 1365.656 | 1129.598 |
| | | | | | | (x=1) | (x=1) |
| DRVYIHPF | DRVYIHPF | (2389.214) | 1194.103 | 795.733 ^{n.d.} | 596.548 ^{n.d.} | 682.325 | 564.295 |
| | | | | | | (x=2) | (x=2) |
| | | | | | | 1161.561 | 1226.645 |
| RPVKVYP NGAEDES AEAFPLEF | RPVKVYP NGAEDES AEAFPLEF | (5226.527) | (2612.760) | 1741.504 | 1305.876 ^{n.d.} | 2580.218 ^{n.d.} | 2645.302 ^{n.d.} |
| | | | | | | (x=1) | (x=1) |
| | | | | | | 1289.605 ^{n.d.} | 1322.147 ^{n.d.} |
| | | | | | | (x=2) | (x=2) |

Tabelle 18 m/z- Werte der möglichen Tempo-Bz-Typ 2- Quervernetzungsprodukte

n.d. ... nicht detektiert, Werte in () außerhalb des Messbereichs

| R ¹ | R ² | Molekülion | | | |
|--------------------------------|--------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | | [M – H ⁺] ⁻ | [M – 2H ⁺] ²⁻ | [M – 3H ⁺] ³⁻ | [M – 4H ⁺] ⁴⁻ |
| TESTDIKR | Intramolekular (Typ 1) | 1246.6318 | 622.8123 | 414.8724 ^{n.d.} | 310.9025 ^{n.d.} |
| | H ₂ O (Typ 0) | 1264.6423 | 631.8175 | 420.8759 | 315.4051 ^{n.d.} |
| | NH ₃ (Typ 0) | 1263.6583 | 631.3225 | 420.5479 ^{n.d.} | 315.1591 ^{n.d.} |
| EADYLIN KER | Intramolekular (Typ 1) | (1547.7744) | 773.3836 | 515.2533 | 386.1881 ^{n.d.} |
| | H ₂ O (Typ 0) | (1565.7849) | 782.3888 | 521.2568 | 390.6908 ^{n.d.} |
| | NH ₃ (Typ 0) | (1564.8009) | 781.8968 | 520.9288 | 390.4448 ^{n.d.} |
| DRVYIHPF | Intramolekular (Typ 1) | 1343.6794 | 671.3361 | 447.2216 ^{n.d.} | 335.1644 ^{n.d.} |
| | H ₂ O (Typ 0) | 1,361.6900 | 680.3413 | 453.2251 | 339.6670 ^{n.d.} |
| | NH ₃ (Typ 0) | 1,360.7059 | 679.8493 | 452.8971 ^{n.d.} | 339.4210 ^{n.d.} |
| RPVKVYP NGAEDES AEAFPLEF | Intramolekular (Typ 1) | (2,762.3359) | 1,380.6643 | 920.1071 | 689.8285 |
| | H ₂ O (Typ 0) | (2780.3465) | 1389.6696 | 926.1107 | 694.3312 |
| | NH ₃ (Typ 0) | (2779.3625) | 1389.1776 | 925.7826 ^{n.d.} | 694.0852 ^{n.d.} |

Tabelle 19 m/z- Werte der möglichen Tempo-Bz-Typ 0 und Typ 1- Quervernetzungsprodukte

n.d. ... nicht detektiert, Werte in () außerhalb des Messbereichs

| R ¹ | R ² | m/z - Werte | | | |
|-----------------------------|---|------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | | [M - H ⁺] ⁻ | [M - 2H ⁺] ²⁻ | [M - 3H ⁺] ³⁻ | [M - 4H ⁺] ⁴⁻ |
| TESTDIKR | EADYLINKER | (2496.261) | 1247.627 | 831.416 | 623.310 |
| TESTDIKR | [R ¹ -Bz - xH ⁺] ^{•x-} | 1064.514 | 531.753 | | |
| TESTDIKR | [R ¹ -TEMPO - xH ⁺] ^{•x-} | 1129.598 | 564.295 | | |
| EADYLINKER | TESTDIKR | (2496.261) | 1247.627 | 831.416 | 623.310 |
| EADYLINKER | [R ¹ -Bz - xH ⁺] ^{•x-} | 1365.656 | 682.325 | | |
| EADYLINKER | [R ¹ -TEMPO - xH ⁺] ^{•x-} | 1430.740 | 714.867 | | |
| DRVYIHPF | DRVYIHPF | (2389.214) | 1194.103 | 795.733 ^{n.d.} | 596.548 ^{n.d.} |
| DRVYIHPF | [R ¹ -Bz - xH ⁺] ^{•x-} | 1161.561 | 580.277 ^{n.d.} | | |
| DRVYIHPF | [R ¹ -TEMPO - xH ⁺] ^{•x-} | 1226.645 | 612.819 ^{n.d.} | | |
| RPVKVYPNGA- EDESAEAFPLEF | RPVKVYPNGA- EDESAEAFPLEF | (5226.527) | (2612.760) | 1741.504 | 1305.876 ^{n.d.} |
| RPVKVYPNGA- EDESAEAFPLEF | [R ¹ -Bz - xH ⁺] ^{•x-} | 2580.218 ^{n.d.} | 1289.605 ^{n.d.} | | |
| RPVKVYPNGA- EDESAEAFPLEF | [R ¹ -TEMPO - xH ⁺] ^{•x-} | 2645.302 ^{n.d.} | 1322.147 ^{n.d.} | | |

Tabelle 20 m/z- Werte der möglichen Produktionen im MS/MS von Tempo-Bz-Typ 2-Quervernetzungsprodukten

n.d. ... nicht detektiert, Werte in () außerhalb des Messbereichs

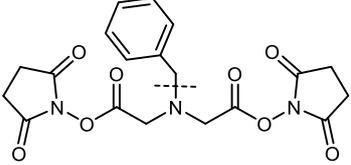
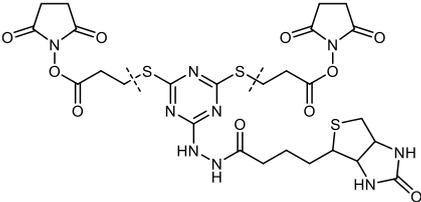
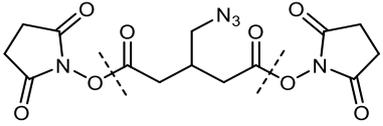
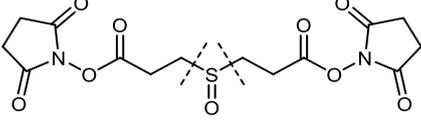
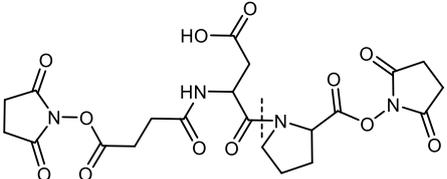
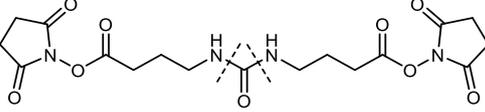
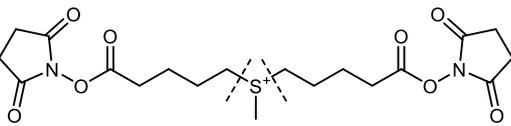
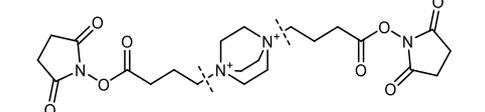
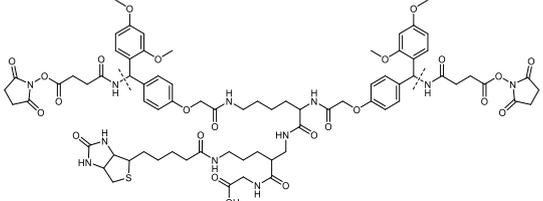
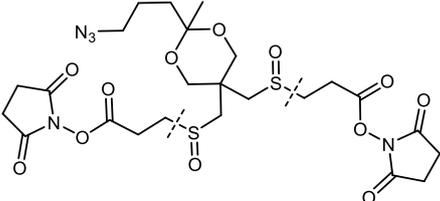
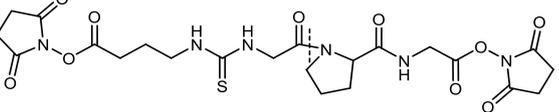
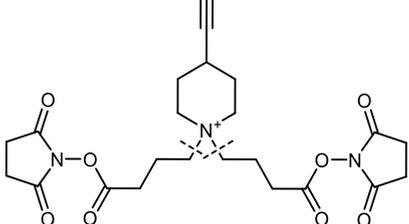
| Name und Struktur des Vernetzungsreagenzes | Länge (Jahr) | Name und Struktur des Vernetzungsreagenzes | Länge (Jahr) |
|---|------------------|---|------------------|
|  BID [94] | 4.3 Å (2001) |  CBDPS [260] | 14.0 Å (2011) |
| MS/MS-spaltbar nach Reduktion  BAMG [93] | 4.3 Å (2007) |  Disuccinimidylsulfoxid (DSSO) [261] | 10,1 Å (2011) |
|  SuDP [188] | 9.1 Å (2007) |  Disuccinimidyl dibutylurea (DSBU, BuUrBu) [196] | 12,5 Å (2011) |
|  S-Methyl 5,5'-Thiodipentanoilhydroxysuccinimididid [262] | 12.7 Å (2008) |  1,4-Bis(4-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-4-oxobutyl)-1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane-1,4-dium dibromid (DC4) [263] | 13,6 Å (2012) |
|  PIR [19] | 43 Å (2010) |  Azide-A-DSBSO [264] | 12,9 Å (2015) |
|  Edman-Linker [191] | 16.7 Å (2010) |  1,1-Bis(4-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-4-oxobutyl)-4-ethynylpiperidin-1-iumchlorid/iodid (PAC4) [265] | 8,8 Å (2018) |

Tabelle 21 Struktur und Länge einiger spaltbarer Quervernetzungsreagenzien, angepasst aus [111].

Die homobifunktionellen und trifunktionellen Vernetzungsreagenzien sind mittels Tandem-Massenspektrometrie (CID-MS/MS) spaltbar; gestrichelte Linien zeigen die Spaltstellen an.

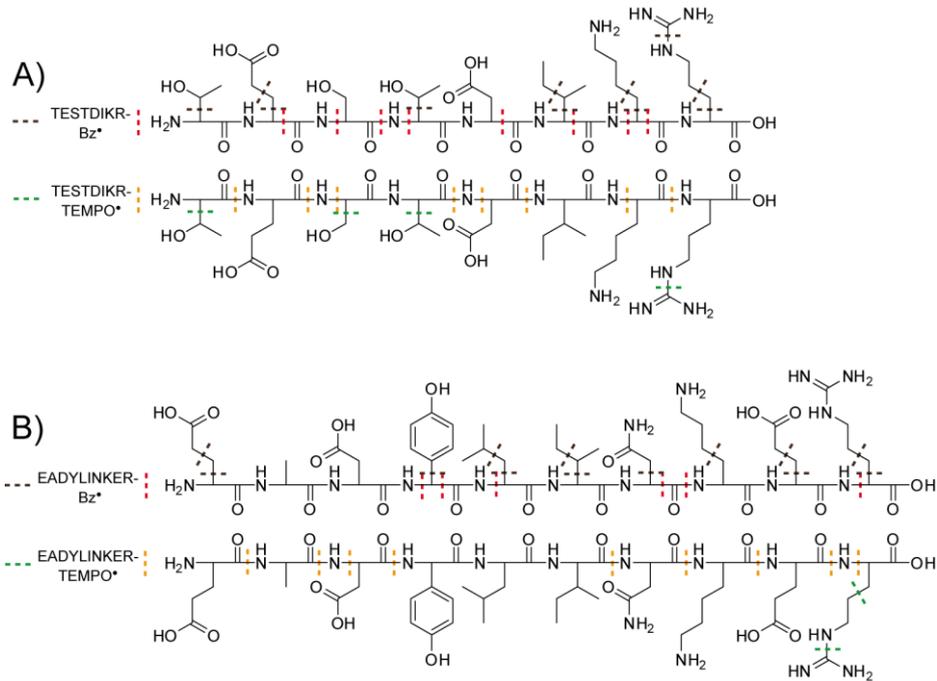


Abbildung 72 Schematische Darstellung der Fragmentierungsmuster der Bz-, bzw. TEMPO-modifizierten Peptide, mod. nach [254]

Peptide: A) TESTDIKR B) EADYLINKER

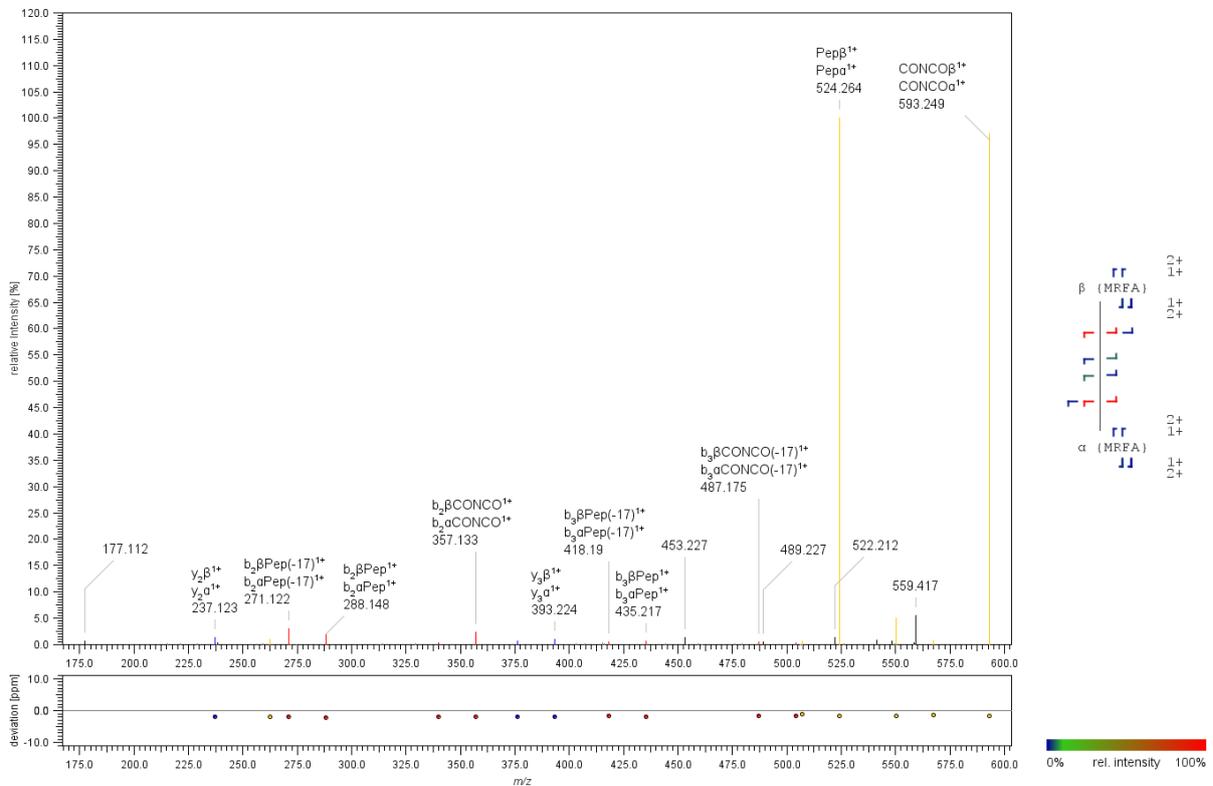


Abbildung 73 HCD-MS/MS, Typ 2-Quervernetzungsprodukt von MRFA und IDDI-Linker (Vorläuferion m/z 558,750)

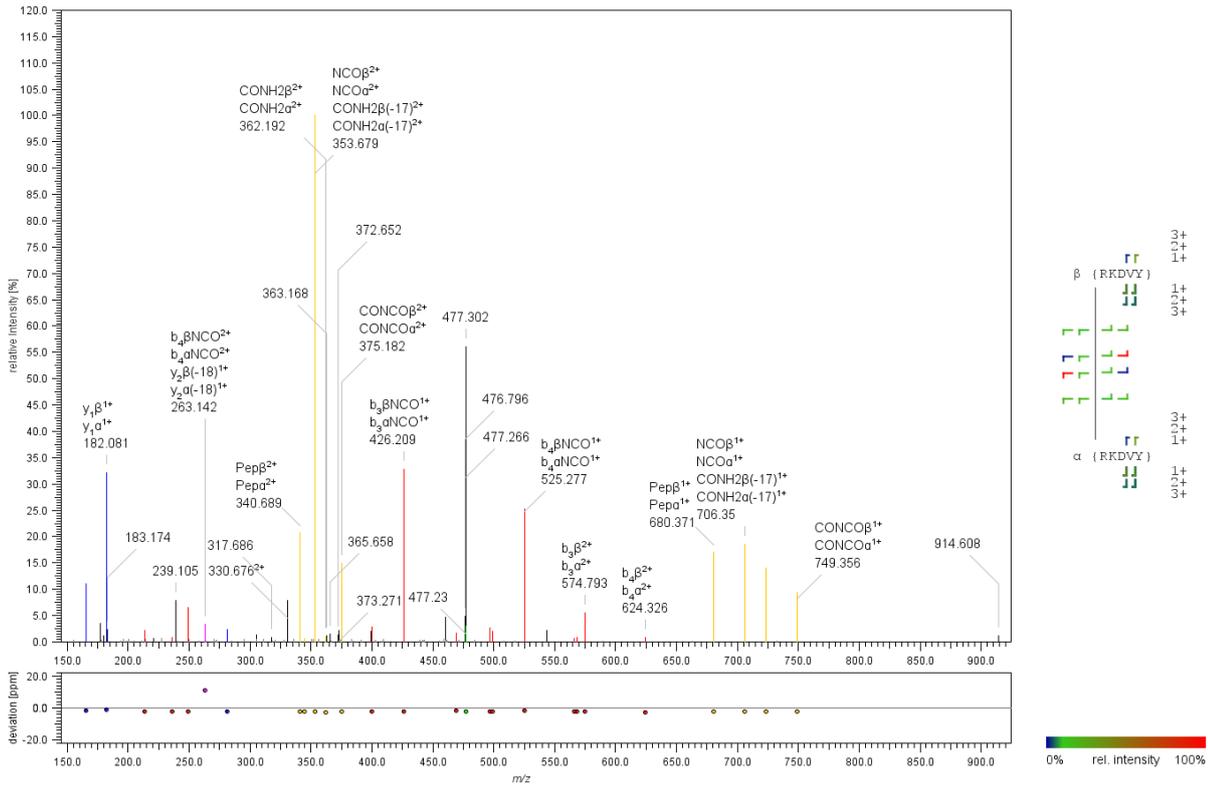


Abbildung 74 HCD-MS/MS, Typ 2– Quervernetzungsprodukt von Thymopentin und IDDI-Linker (Vorläuferion m/z 476,900)

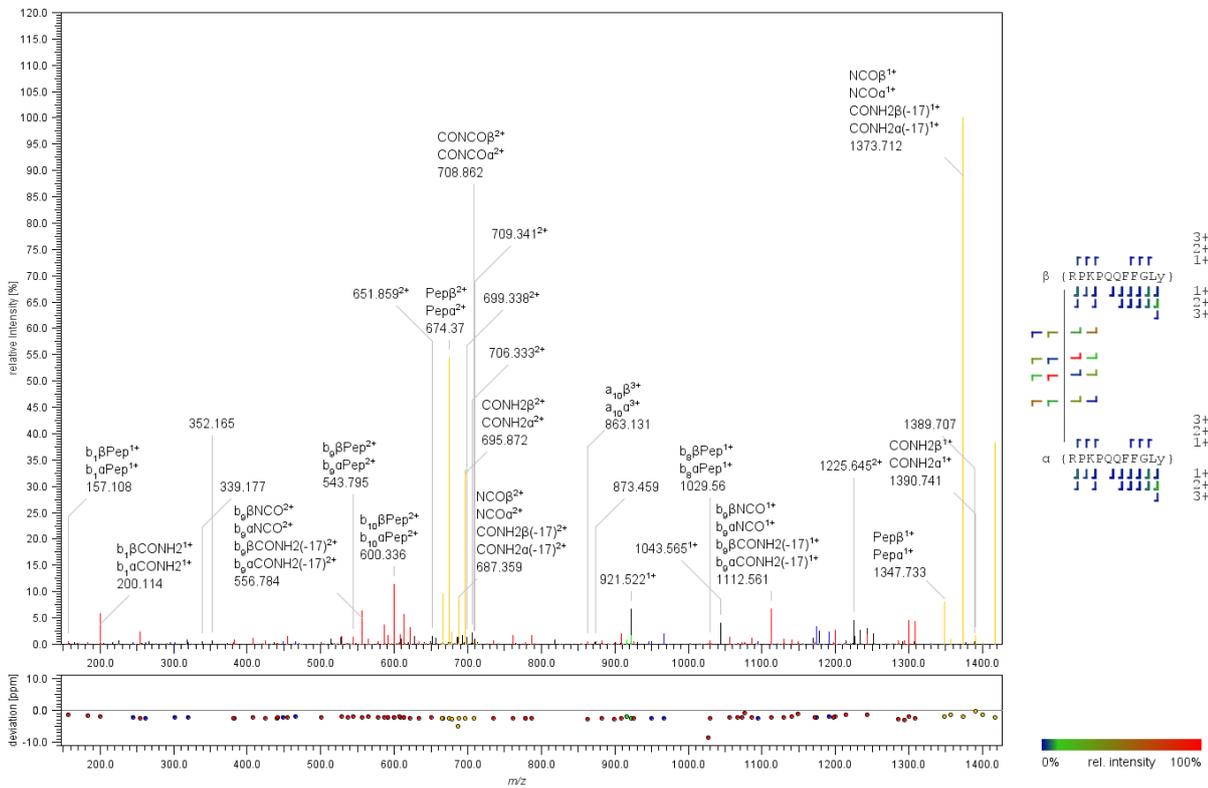


Abbildung 75 HCD-MS/MS, Typ 2– Quervernetzungsprodukt von Substanz P und dem IDDI-Linker (Vorläuferion m/z 921,800)