

# Kurzzusammenfassung

In dieser Arbeit wurden verschiedene dissoziative Cross-Linker zur Proteinstrukturanalyse mittels Tandem-MS konzeptioniert, hergestellt und getestet. Die Grundlage des dissoziativen Konzepts des anfänglich hergestellten Cross-Linkers ist der zum Edman-Abbau analoge nukleophile Angriff eines Thioharnstoffschwefels auf die benachbarte Amidbindung. Durch den zusätzlichen Einbau der basischen, sekundären Aminosäure Prolin wird die selektive Dissoziation dieses Edman-Cross-Linkers unter CID-Bedingungen sichergestellt. Nach der anspruchsvollen Synthese wurde dieser Cross-Linker anhand von Modell-Peptiden bzw. Proteinen getestet. Hierbei konnte nicht nur das zugrunde liegende analytische Konzept verifiziert werden, sondern zusätzlich zu der geplanten Cross-Linker-Dissoziation treten bei der ESI-LQIT-MS/MS-Analyse charakteristische Neutralverluste aus dem Edman-Cross-Linker auf, die eine sensitive, selektive und elegante Identifikation derivatisierter Peptide über CNL-Experimente ermöglichen.

Zur Klärung der bei MALDI-TOF/TOF-Analysen unerwartet aufgetretenen Fragmentierungen wurde ein symmetrischer Thioharnstoff-Cross-Linker ohne Prolinfunktion entwickelt, hergestellt und getestet, wobei die Bedeutung des Prolins bei der Fragmentierung des Edman-Cross-Linkers belegt wurde. Dieser Thioharnstoff-Cross-Linker weist ebenfalls charakteristische Neutralverluste auf, jedoch wird durch eine intramolekulare Zyklisierung des Cross-Linkers bei dead-end derivatisierten Peptiden seine effektive Anwendung zur Proteinstrukturaufklärung unterbunden.

Zur Vermeidung dieses Zyklisierungsproblems wurde ein „Sauerstoff analoger“ Harnstoff-Cross-Linker synthetisiert und analog der vorherigen Cross-Linker getestet. Dieser Cross-Linker zeigt aufgrund der geringeren Nukleophilie des Sauerstoffs – gegenüber des Schwefels im Thioharnstoff-Cross-Linker – eine abweichende Fragmentierung, wobei durch das Fehlen des Schwefels dead-end Cross-Links beständig sind und nicht mehr zyklisieren. Der Harnstoff-Cross-Linker konnte nicht nur die zentrale Rolle des Schwefels in den beiden vorherigen Cross-Linkern belegen, sondern durch seine spezifische Dissoziation liefert er darüber hinaus in hohen Intensitäten charakteristische Produktionspaare mit einer Massendifferenz von 26 u, wodurch eine selektive und sensitive Identifizierung von derivatisierten Peptiden ermöglicht wird.

Insgesamt konnte das analytische Konzept dissoziativer Cross-Linker bestätigt werden und eignet sich ausgezeichnet zur Identifizierung von Cross-Linking-Reaktionsprodukten mittels Tandem-MS.

## Abstract

This work describes the development and application of new dissociative cross-linking reagents for protein structure elucidation by tandem-mass spectrometry. The first successful synthesized cross-linking reagent was based on the Edman degradation, especially the nucleophilic attack of a thiourea sulfur on the neighboring amide bond. The additional introduction of the basic amino acid proline into the Edman-cross-linker ensures the preferred dissociation of the cross-linker under CID-conditions. After the sophisticated synthesis the Edman-cross-linker was tested for applicability with model peptides and proteins. Not only the analytical concept was verified, but also a characteristic CNL was detected, which allows a reliable and selective identification of derivatized peptides in CNL-experiments.

To elucidate the role of proline within unexpected fragmentations in MALDI-TOF/TOF-analysis a symmetric thiourea-cross-linker without proline functionality was developed, synthesized and applied in cross-linking reactions. This thiourea-cross-linker also shows a characteristic CNL, but because of its intermolecular cyclization in dead-end cross-links, the thiourea-cross-linker is not effective suitable for protein structure elucidation.

To circumvent this cyclization, an „oxygen-analog“ urea-cross-linker was synthesized and tested as before. Due to the lower nucleophilicity of oxygen – compared to sulfur – the urea-cross-linker shows a different fragmentation behavior as the thiourea-cross-linker. Furthermore dead-end cross-linked products are stable and don't show cyclization. The urea-cross-linker not only proved the outstanding role of the sulfur in the Edman- and thiourea-cross-linker, but also its specific fragmentation behavior provides intensive, characteristic product ions pairs with a mass difference of 26 u, which allows the sensitive and selective identification of derivatized peptides.

Altogether the concept of dissociative cross-linking reagents was confirmed and is perfectly suitable for identification of cross-linked products by tandem mass spectrometry.