

**Massenspektrometrische Analyse von  
Peptiden und Peptidderivaten – Steuerung  
der Fragmentierung einfach und mehrfach  
geladener Ionen durch gezielte chemische  
Modifikationen**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln  
vorgelegt von

Guido Sonsmann  
aus Münster

Köln 2001

Berichterstatter: Prof. Dr. Dietmar Schomburg  
Prof. Dr. F.-J. Marner

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Februar 2001

# Inhaltsverzeichnis

<a href="#">Danksagung</a> .....	5
<a href="#">Erklärung</a> .....	6
<a href="#">Kurzzusammenfassung</a> .....	10
<a href="#">Abstract</a> .....	10
<b>1</b> <a href="#">Einleitung</a> .....	11
1.1 <a href="#">Massenspektrometrie in der Biochemie</a> .....	11
<b>2</b> <a href="#">Theoretische Grundlagen</a> .....	14
2.1 <a href="#">Prinzip der Massenspektrometrie</a> .....	14
2.2 <a href="#">Ionisationsverfahren zur Analyse von Biomolekülen</a> .....	14
2.2.1 <a href="#">Fast Atom Bombardment (FAB)</a> .....	15
2.2.2 <a href="#">MALDI-Ionisationsprozess</a> .....	15
2.2.3 <a href="#">Elektro-Spray-Ionisationsverfahren (ESI)</a> .....	17
2.3 <a href="#">Analysatoren</a> .....	21
2.3.1 <a href="#">Flugzeitmassenspektrometrie (<i>time of flight</i>, TOF)</a> .....	21
2.3.2 <a href="#">Quadrupol-Analysatoren</a> .....	25
2.3.3 <a href="#">Elektrische Ionenfalle nach PAUL</a> .....	26
2.3.4 <a href="#">Magnetische Ionenfalle</a> .....	27
2.4 <a href="#">Tandem Massenspektrometrie (MS/MS)</a> .....	28
2.4.1 <a href="#">Niederenergie-Stoßaktivierung in der Ionenfalle</a> .....	29
2.4.2 <a href="#">In-Source-Fragmentierung</a> .....	30
2.4.3 <a href="#">Metastabiler Zerfall bei der MALDI-Ionisation (<i>Post-Source-Decay</i>, PSD)</a> .....	30
2.4.4 <a href="#">Fragmentierung von Peptiden</a> .....	32
2.4.5 <a href="#">Nomenklatur der Fragment-Ionen nach ROEPSTORFF und FOHLMANN</a> .....	33
2.4.6 <a href="#">Entstehung und Nomenklatur innerer Fragment-Ionensequenzen</a> .....	34
2.4.7 <a href="#">Fragmentierungsmechanismen einfach geladener Peptide</a> .....	35
2.4.8 <a href="#">Fragmentierungsmechanismen zweifach geladener Peptide</a> .....	36
2.4.9 <a href="#">Fragmentierungsverhalten mehrfach geladener Peptide</a> .....	37
2.5 <a href="#">Derivatisierung von Peptiden</a> .....	39
2.6 <a href="#">natürliche post-translationale Protein-Modifikationen</a> .....	39
2.6.1 <a href="#">Glykosylierung</a> .....	40
2.6.2 <a href="#">Phosphorylierung</a> .....	41
2.6.3 <a href="#">Sulfatierung</a> .....	41
2.7 <a href="#">Derivatisierungen zur Manipulation von Fragment-Ionenspektren</a> .....	42

---

2.7.1	<a href="#">Acylierung der basischen Zentren</a>	43
2.7.2	<a href="#">Einführung einer positiven Ladung</a>	44
2.7.3	<a href="#">Einführung einer negativen Ladung</a>	44
2.7.4	<a href="#">Isotopenlabelung</a>	45
3	<a href="#">Zielsetzung der Dissertation</a>	47
4	<a href="#">Material und Methoden</a>	48
4.1	<a href="#">Materialien und Geräte</a>	48
4.1.1	<a href="#">Verwendete Proteine</a>	48
4.1.2	<a href="#">Verwendete Chemikalien</a>	48
4.1.3	<a href="#">Verwendete Laborgeräte</a>	49
4.1.4	<a href="#">Verwendete Computersoftware</a>	50
4.2	<a href="#">Methoden</a>	50
4.2.1	<a href="#">Präparation der A- und B-Kette des Rinder-Insulins</a>	50
4.3	<a href="#">Derivatisierung von Peptiden</a>	52
4.3.1	<a href="#">Acetylierung von primären Aminogruppen in Proteinen</a>	52
4.3.2	<a href="#">Bromnikotinylierung nach MIYAGI et. al.<sup>96</sup></a>	53
4.3.3	<a href="#">Alkylierung primärer Amine mit (Bromo-ethyl)-triphenylphosphin</a>	54
4.3.4	<a href="#">Acylierung primärer Amine mit Chloro-Sulfonylacetyl-Chlorid (CSAC)</a>	55
4.4	<a href="#">MALDI-Proben</a>	55
4.4.1	<a href="#">Probenvorbereitung</a>	55
4.4.2	<a href="#">Target-Präparation</a>	56
4.4.3	<a href="#">Aufnahme der MALDI-Spektren</a>	56
4.4.4	<a href="#">Aufnahme der MALDI-PSD Spektren</a>	57
4.5	<a href="#">ESI-Proben</a>	58
4.5.1	<a href="#">Aufnahme der ESI-Spektren</a>	58
4.5.2	<a href="#">Bestimmung der optimalen Kollisionsenergie für MS/MS-Experimente in der Ionenfalle</a>	59
5	<a href="#">Ergebnisse</a>	61
5.1	<a href="#">Angiotensin I - ein Modellpeptid</a>	61
5.1.1	<a href="#">Fragmentierung von Angiotensin I unter ESI Bedingungen</a>	61
5.1.2	<a href="#">Acetylierung von Angiotensin I</a>	68
5.1.3	<a href="#">Sulfonylierung von Angiotensin I</a>	73
5.1.4	<a href="#">Einfluss der Acetylierung und der Sulfonylierung auf das Fragmentierungsverhalten von Angiotensin I</a>	77

---

<u>5.2</u>	<u>Einfluss von Iodessigsäure und Iodacetamid bei der reduktiven Alkylierung des Rinder-Insulins auf das Fragmentierungsverhalten</u>	81
<u>5.3</u>	<u>A-Kette des Rinder-Insulins</u>	83
5.3.1	<u>A-Kette des Rinder-Insulins, carbamidiert</u>	83
5.3.2	<u>Acetylierung der carbamidierten A-Kette des Rinder-Insulins</u>	86
5.3.3	<u>Einfluss der Acetylierung auf das Fragmentierungsverhalten der A-Kette des Rinder-Insulins</u>	89
5.3.4	<u>Derivatisierung der A-Kette des Rinder-Insulins mit (Bromo-ethyl)-triphenylphosphin</u>	90
5.3.5	<u>Einfluss der Alkylierung mit Br-TPP auf die Spektren der A-Kette des Rinder-Insulins</u>	94
<u>5.4</u>	<u>B-Kette des Rinder-Insulins</u>	95
5.4.1	<u>Carbamidierung der B-Kette des Rinder-Insulins</u>	95
5.4.2	<u>Vergleich des Fragmentierungsverhaltens der carbamidierten B-Kette bei unterschiedlichen Ladungszuständen der Vorläufer-Ionen</u>	101
5.4.3	<u>Acetylierung der B-Kette des Rinder-Insulins</u>	102
5.4.4	<u>Einfluss der Acetylierung auf die Fragmentierung der B-Kette des Rinder-Insulins</u>	106
5.4.5	<u>Acylierung der B-Kette des Rinder-Insulins mit Bromnikotinsäure</u>	107
5.4.6	<u>Alkylierung der B-Kette des Rinder-Insulins mit Brom-Ethyl-Triphenylphosphin</u>	109
5.4.7	<u>Bis-TPP-Derivat der B-Kette des Rinder-Insulins</u>	114
5.4.8	<u>Einfluss der Alkylierung mit Brom-Triphenyl-Phosphin auf das Fragmentierungsverhalten der B-Kette des Rinder-Insulins</u>	118
5.4.9	<u>Sulfonylierung mit Chlor-Sulfonylacetyl-Chlorid, CSAC der B-Kette des Rinder-Insulins</u>	121
5.4.10	<u>Mono-Derivat der sulfonylierten B-Kette des Rinder-Insulins</u>	122
5.4.11	<u>Einfluss der Mono-Sulfonylierung der B-Kette des Rinder-Insulins auf das Fragmentierungsverhalten</u>	124
5.4.12	<u>Bis-Derivat der sulfonylierten B-Kette des Rinder-Insulins</u>	125
5.4.13	<u>Einfluss der Bis-Sulfonylierung auf das Fragmentierungsverhalten der B-Kette des Rinder-Insulins</u>	129
<u>5.5</u>	<u>Glucagon</u>	130
5.5.1	<u>MS-Spektrum des underivatisierten Glucagons</u>	131
5.5.2	<u>Einfluss der Protonen auf das Fragmentierungsverhalten von Glucagon</u>	137
5.5.3	<u>Acetylierung des Glucagons</u>	139

---

5.5.4	<a href="#">Einfluss der Acetylierung auf das Fragmentierungsverhalten von Glucagon</a> .....	144
5.5.5	<a href="#">Fragmentierung des sulfonylierten Glucagons</a> .....	146
5.5.6	<a href="#">Einfluss der Sulfonylierung auf das Fragmentierungsverhalten des Glucagons</a> .....	151
5.6	<a href="#">ROS-Peptid (Rhodopsin-Outer-Segment-Peptid)</a> .....	153
5.6.1	<a href="#">Fragment-Ionenspektrum des unphosphorylierten ROS-Peptids</a> .....	153
5.6.2	<a href="#">Fragment-Ionenspektrum des zweifach phosphorylierten ROS-Peptids</a> .....	154
5.6.3	<a href="#">Fragmentierungsverhalten des phosphorylierten und N-terminal acetylierten ROS-Peptids</a> .....	156
6	<a href="#">Diskussion der Ergebnisse</a> .....	157
6.1	<a href="#">Selektivität und Nebenreaktionen bei Derivatisierungen</a> .....	157
6.2	<a href="#">Einfluss von Derivaten an basischen Zentren auf das Fragmentierungsverhalten</a> .....	158
6.2.1	<a href="#">Verringerung der Basizität durch Acylierung</a> .....	158
6.2.2	<a href="#">Einführung einer positiven Ladung über Phosphonium-Salze</a> .....	160
6.2.3	<a href="#">Einführung einer negativen Ladung</a> .....	161
6.3	<a href="#">Markierung von Fragment-Ionen mit stabilen Isotopen</a> .....	162
6.4	<a href="#">Protonierungsgrad von Peptiden</a> .....	163
6.5	<a href="#">Einfluss des Protonierungsgrades auf das Fragmentierungsverhalten mehrfach geladener Vorläufer-Ionen</a> .....	164
6.6	<a href="#">Sequenzspezifische Einflüsse</a> .....	166
6.6.1	<a href="#">Prolin-Effekt</a> .....	166
6.6.2	<a href="#">Einfluss basischer Aminosäuren auf die Sequenzierung „basische Löcher“ in der Aminosäuresequenz durch Histidin und Arginin</a> .....	167
6.6.3	<a href="#">Einfluss saurer Aminosäuren</a> .....	168
6.7	<a href="#">Theorie des Fragmentierungsverhalten mehrfach geladener Peptide</a> .....	170
6.8	<a href="#">Rückschlüsse für die „de novo“ Sequenzierung von mehrfach geladenen Peptiden</a> .....	172
6.9	<a href="#">Zusammenfassung der Ergebnisse</a> .....	173
6.10	<a href="#">Ausblick</a> .....	174
7	<a href="#">Anhang</a> .....	175
7.1	<a href="#">Übersicht über die verwendeten Peptide/Proteine</a> .....	175
7.2	<a href="#">Literaturverzeichnis</a> .....	176

## **Danksagung**

Diese Arbeit wurde von Oktober 1998 bis Dezember 2000 am Lehrstuhl für Biochemie der Universität zu Köln unter Anleitung von Prof. Dr. Dietmar Schomburg angefertigt.

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg für die Vergabe des interessanten Themas, seine stets vorhandene Diskussionsbereitschaft und für die exzellenten technischen Rahmenbedingungen.

Herrn Dr. Axel Römer von der Firma A&M GmbH, für die intensive Einführung in die Geheimnisse der Massenspektrometrie, seine Begeisterungsfähigkeit für das Thema, von der ich mich gerne habe anstecken lassen und für seine Geduld.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Franz-Joseph Marnier für die Einweisung an den massenspektrometrischen Geräten.

Herrn Dipl.-Chem. Martin Lang für die Unterstützung bei den organischen Synthesen der Derivatisierungsreagenzien und für seine Freundschaft.

Herrn Dipl. Chem. Lejon Martens für die kritischen Diskussionen, den „goldenen Korrekturstift“, die Sprints am Berg und seine Freundschaft.

Herrn Dipl.-Biologe Peter Krämer für die Hilfe bei Fragen zur Wunderwelt des binären Codes.

Herrn Norbert Hochstein für die Kooperation und seine Fragen während seines Etagenpraktikums.

Allen meinen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises für das freundliche und stets lebendige Arbeitsklima und ihre stets offenen Ohren für die Probleme des Laboralltages. Es war eine schöne Zeit.

Den Weihnachtsmännern, der Betriebssportgruppe Marathon, dem GLB1 und GLB2 für die Versorgung mit Kuchen und der „Hanuta“-Station der ersten Etage.

Oliver Martin, Jan Abendroth, Andrea Eifert, Mario Schelhaas, Stephanie Berger und Johanne Berger für die unermüdliche Jagd auf die Fehlerteufelchen.

Meinen Eltern, meinem Bruder, meiner Freundin, meinen Freunden in Köln und in Xanten für ihre Geduld und ihre Fähigkeit mich so zu akzeptieren, wie ich bin. Ich hoffe, all dies wieder zurückgeben zu können.

## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat, dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. D. Schomburg betreut worden.

Guido Sonsmann

### ***Publikation:***

G. Sonsmann, A. Römer, D. Schomburg; Isotope labeling enhances the interpretation of MS-spectra of “de novo” peptide sequencing, *Proceedings of the 48<sup>th</sup> Annual Conference of the American Society of Mass Spectrometry*, Long Beach (2000).

### ***Posterbeiträge:***

- Peptidsequenzierung nach Derivatisierung: Identifizierung eines “bekanntem” unbekanntem Peptids, Industriekooperationstagung an der Uni Köln (2000).
- Peptidsequenzierung mit Isotopenlabeln: Identifizierung eines Glutathionderivates, DGMS-Tagung in Berlin (2000).

1. Referent: Prof. Dr. D. Schomburg

2. Referent: Priv.-Doz. Dr. F.-J. Marner

Eingereicht: Dezember 2000

Disputationsprüfung: 13. Februar 2001

---

# Abkürzungsverzeichnis

## Aminosäuren

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

## Sonstige Abkürzungen

ACN	Acetonitril
APCI	<i>Atmospheric-Pressure-Chemical-Ionisation</i>
AS	Aminosäure (n)
CCA	$\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure
CSAC	Chloro-Sulfonylacetyl-Chlorid
Da	Dalton (1 Da = 1 g/mol)
DE	<i>Delayed-Extraction</i>
DMF	Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>
FPLC	<i>Fast-Protein-Liquid-Chromatography</i>
g	Gramm
HCOOH	Ameisensäure
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
IAA	Iodacetamid
ISD	<i>In-Source-Decay</i>
k	kilo
l	Liter
LC	Liquid Chromatography
LCQ	<i>Ion trap</i> Gerät Finnigan
M	molar
MALDI	<i>Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation</i>
MeOH	Methanol
min	Minute
mM	millimolar
Mol	Teilchenzahl (1 mol = $6.02310^{23}$ Teilchen)
MRFA	Quadro-Peptid zur Kalibrierung
MS	Massenspektrometrie
p. a.	pro analysis
PIE	<i>Post-Ionization Extraction</i>
v/v	Volumenverhältnis
PSD	<i>Post-Source-Decay</i>

---

ROS	<i>Rhodopsin Outer Segment</i>
RT	Raumtemperatur
RZ	Retentionszeit
SA	Sinapinsäure
sek	Sekunde
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TOF	Time-Of-Flight
TPP	Triphenylphosphin
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-amminomethan
UV	Ultraviolett

## ***Kurzzusammenfassung***

Das Fragmentierungsverhalten von einfach und mehrfach geladenen Modell-Peptiden (Angiotensin I, A-Kette und B-Kette des Rinder-Insulins, Glucagon) wird beschrieben. Die MS<sup>2</sup>-Experimente wurden unter Niederenergie-Stoßaktivierung mit einer Ionenfalle durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss des Protonierungsgrades und der spezifischen Aminosäuren auf die Fragment-Ionenspektren untersucht.

Um ein besseres Verständnis der Fragmentierungsprozesse zu erhalten, wurde mit chemischen Derivatisierungen am N-Terminus und am Lysin die Protonierung der Peptide in der Gasphase gezielt manipuliert. Die Fragment-Ionenspektren der derivatisierten Peptide wurden mit denen der underivatisierten verglichen. Dabei wurden Unterschiede hinsichtlich der Intensität der Fragment-Ionen aber auch neue Fragmentierungen gefunden. Es konnten Beweise für den Fragmentierungsmechanismus von Aspartat gefunden werden. Die Ergebnisse ermöglichen zudem eine Vorhersage über die bevorzugten Fragmentierungseigenschaften der Peptidderivate, so dass bei einer Sequenzierung eines unbekanntes Peptids Derivatisierungen gezielt eingesetzt werden können, um eine vollständige Fragmentierung des Peptids zu erreichen.

## ***Abstract***

The fragmentation of singly and multiply charged model-peptides (Angiotensin I, A-chain and B-chain of bovine insulin, Glucagon) is described. All experiments were performed with an ion trap instrument under low energy CID conditions. This research was focused on the influence of charge state and specific amino acids on the fragmentation behaviour of the peptides.

To gain a better understanding of fragmentation processes chemical derivatizations of the N-terminus and the lysine were carried out in order to manipulate the charge state of peptides specifically. Spectra from native and derivatized peptides were compared. They showed obvious differences concerning new fragmentations and their intensity. Additionally, evidence for a specific cleavage was found at the C-terminal residue of aspartat. The results allow predictions of the main fragmentations with “de novo” sequencing of peptides and their derivatives. Derivatization can be used as a valuable tool for a complete sequencing of unknown peptides.

# 1 Einleitung

Nach einer Einführung in die Anwendungsgebiete der Massenspektrometrie in der modernen Biochemie werden die Grundlagen der massenspektrometrischen Methoden beschrieben. Über die Tandem-Massenspektrometrie und die Fragmentierungsmechanismen von Peptiden wird auf posttranslationale Modifikationen von Proteinen und deren Fragmentierungseigenschaften übergeleitet. Der gezielte Einsatz von chemischen Modifikationen an Peptiden zur Beeinflussung des Fragmentierungsverhaltens bildet den Abschluss und gleichzeitig eine Einführung in die Zielsetzung der Dissertation.

## 1.1 Massenspektrometrie in der Biochemie

### ▪ Entwicklung der Massenspektrometrie

Der Weg vom ersten Massenspektrometer (J. J. THOMPSON<sup>1</sup>, Nobelpreis für Physik 1906) mit dem positiv geladene Kathodenstrahlen nachgewiesen werden konnten<sup>2</sup>, über die Messung von Atomgewichten<sup>3</sup> durch F. W. ASTON (Nobelpreis 1922 für die Entdeckung einer großen Zahl von stabilen, nicht radioaktiven Isotopen) zum routinemäßigen Einsatz massenspektrometrischer Methoden (MS-Methoden) in der modernen Biochemie schien zunächst verwehrt. Die empfindlichen und schwer verdampfbaren Proteinmoleküle ließen sich mit den klassischen MS-Methoden<sup>4</sup> (Chemische Ionisation, Elektronenstoß-Ionisation) nicht analysieren. Erst mit der Entwicklung sogenannter „sanfter“ Ionisationsverfahren gelang es auch Biomoleküle in die Gasphase zu überführen und so der MS-Analyse zugänglich zu machen.

Zu den „sanften“ Ionisationsverfahren gehören *Fast-Atom-Bombardment*<sup>5</sup> (FAB), *Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization*<sup>6</sup> (MALDI) und *Electro-Spray-Ionization* (ESI). Erste Proteinmessungen wurden mit FAB-Geräten gemacht. Als Folge der Entwicklung des MALDI-Ionisationsverfahrens können Proteine mit einer Größe von bis zu 200 kDa vermessen werden. Dabei steht vornehmlich die genaue Bestimmung des Molekulargewichts im Vordergrund. Die Weiterentwicklung der MALDI-TOF Geräte führte zur Entwicklung des PSD-Verfahrens (*post-source decomposition*)<sup>7</sup>, mit dem auch Sequenzen<sup>8</sup> bestimmt werden können. Da viele Proteine N-terminal (z. B. Acetylierung) modifiziert vorkommen, bot sich durch die Massenspektrometrie eine sinnvolle Alternative zum klassischen Edmann-Abbau<sup>9</sup> an.

Für die 3D-Strukturaufklärung von Proteinen leistet die Massenspektrometrie neben der Primärstrukturanalyse weitere wichtige Informationen. So können Renaturierungsstudien mit ESI-MS oder Deuterium-Austauschexperimenten durchgeführt werden. Die korrekte Knüpfung von Disulfidbrücken<sup>10</sup> wird durch *peptide-mapping* überprüft. Es können durch Derivatisierungen die an der Oberfläche liegenden Aminosäuren bestimmt werden<sup>11</sup>. Durch „crosslinking“ Experimente

können Informationen über die Lage von Proteinuntereinheiten in Proteinkomplexen gewonnen werden. All diese Informationen sind bei der Strukturaufklärung durch Röntgenstrukturanalyse (RSA) und NMR wichtige Hilfsmittel zur Strukturlösung.

#### ▪ Massenspektrometrie in der biochemischen Analytik

Nach der Sequenzierung des menschlichen Genoms steht unter dem Stichwort Proteomics<sup>12</sup> die nächste weitaus größere Herausforderung zur Aufklärung der Biochemie von Organismen bevor. Nachdem die komplette Erbinformation für diverse Organismen auf DNA-Ebene aufgeklärt ist, gilt es nun das Proteom aufzuklären. Das Wort Proteom setzt sich aus Protein und Genom zusammen und beschreibt die Gesamtheit der in einer Zelle oder einem Organismus vorhandenen Proteine. Dabei können je nach Differenzierungsgrad der Zelle verschiedene Proteine expremiert sein. Bei der Analyse des Proteoms einer Zelle werden zunächst sämtliche Proteine mit einer 2D-Gel Elektrophorese nach dem isoelektrischen Punkt und dem Molekulargewicht aufgetrennt<sup>13</sup>. Die im Gel fixierten und sichtbar gemachten Proteine werden im ausgeschnittenen Gelstück tryptisch verdaut und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Für die Analyse der tryptischen Peptid-Fragmente (*peptide map*<sup>14</sup>) sind MALDI-TOF oder HPLC-ESI-MS<sup>15</sup> die Methoden der Wahl. Die Analyse der MS/MS Daten ergibt Teilsequenzen, mit denen eine Datenbankrecherche durchgeführt werden kann. Entweder wird die experimentell ermittelte Sequenz mit den Sequenzen einer DNA Datenbank<sup>I</sup> oder mit den Aminosäuresequenzen aus Proteindatenbanken<sup>II</sup> verglichen<sup>16</sup>, die Fragment-Ionen von bekannten, bereits isolierten Proteinen (bzw. deren tryptischen Verdaue) enthalten. So können aus dem 2D-Gel die Spots bereits bekannter Proteine identifiziert werden. Dieses Verfahren ist ähnlich der Genomsequenzierung mit einem hohen Maß an Automatisierung und mit einer hohen Durchsatzrate (*high-throughput*) verbunden.

Die Prozessierung der DNA-Erbinformation erfolgt nicht im Maßstab eins zu eins, so dass die aus der DNA übersetzte Primärsequenz der Proteine nicht der tatsächlichen Struktur entspricht<sup>17</sup>.

Allgemein bekannt sind eine Reihe von post-translationalen Modifikationen:

- Signalsequenzen, die zwar auf dem Gen codiert sind und auch zunächst translatiert werden, im „reifen“ Protein aber abgespalten worden sind, bzw. dem Proteintargeting behilflich sind.
- Abspaltungen, wie die des N-terminalen Methionins von rekombinanten Proteinen bei der Expression in *Escherichia coli*<sup>18</sup>

---

<sup>I</sup> DNA-Datenbanken enthalten Peptidsequenzen, die aus DNA-Sequenzen übersetzt wurden, von den bekannt ist, das sie als ORF (*open reading frames*) vorliegen.

<sup>II</sup> Proteindatenbanken enthalten die theoretischen Massen der tryptischen Fragmente, bzw. die Massen der Fragment-Ionen von tryptischen Fragmenten.

- Markierungen, die einen Alterungsprozess bedeuten, bzw. das Protein für den Abbau in der Zelle identifizieren.
- *Protein splicing*<sup>19</sup>, bei dem eine katalytische Domäne (Intein) des exprimierten Proteins autokatalytisch eine Teilsequenz abspaltet.
- Übersetzungsfehler Mutationen und Abbruchfragmente bei der Translation, die Funktionalität und Struktur des Proteins beeinflussen können.
- Glykosylierungen und andere Modifikationen, die bei der Signaltransduktion und Signalerkennung die Ligand-Rezeptor Spezifität bewirken.

Was aber, wenn sich die ermittelte Teilsequenz nicht in einer DNA-Datenbank wiederfinden lässt, es sich also um ein neues Protein mit unbekannter Sequenz und Funktion handelt? In einem solchen Fall muss die Analyse der MS/MS Daten mehr leisten als nur die Identifizierung einer Teilsequenz zur Datenbankanalyse. Hier ist eine Totalsequenzierung bzw. eine „de novo“ Sequenzierung des Proteins nötig. Die einzelnen Fragment-Ionen müssen eine komplette Sequenz (Sequenzabdeckung) ergeben. Aus dem Fragment-Ionenspektrum sind die einzelnen Fragment-Ionen nicht ohne weiteres zu identifizieren. Die gezielte chemische Derivatisierung von Peptiden soll dabei die Interpretation der Spektren erleichtern, indem die Fragmentierung der Molekül-Ionen verbessert wird.

#### ▪ **Einsatz der Massenspektrometrie in der pharmazeutischen Analytik**

Im Arzneimittelbereich werden immer mehr Proteinpharmaka auf den Markt gebracht. Wirkstoffe werden an körpereigene Proteine gekoppelt, um die individuelle Verträglichkeit zu verbessern. Diese artifiziell veränderten Biomoleküle sind aber dennoch Naturprodukte, die oxidationsempfindlich sind. Da diese Substanzen dem Arzneimittelgesetz unterliegen, muss eine Reinheitsanalyse durchgeführt werden. Die Massenspektrometrie als schnelles, reproduzierbares Analyseverfahren ermöglicht in Kopplung mit der Flüssigkeitschromatographie eine verlässliche und hochempfindliche Methode zur Detektion von Verunreinigungen und Abbauprodukten.

Mit dem Einsatz von ESI-Massenspektrometern, die mit Quadrupol-Analysatoren arbeiten, lassen sich Metaboliten von Arzneiwirkstoffen quantitativ in biologischen Proben nachweisen. Mit pharmakokinetischen Studien lässt sich die Verteilung der Metaboliten in den verschiedenen Organen untersuchen. Auch hier helfen Derivatisierungsreaktionen, die Identifizierung von Biomolekülen zu erleichtern.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Prinzip der Massenspektrometrie

Unter dem Begriff Massenspektrometrie versteht man das „Wiegen“ von Molekülen bzw. Molekül-Ionen. Ein Massenspektrometer besteht aus drei Komponenten: Ionisationskammer, Massenanalysator (Ionentrennung) und Detektor. Um Ionen in der Gasphase zu analysieren, müssen die Analytmoleküle zunächst verdampft und ionisiert werden. Dies kann durch Kopplung des Massenspektrometers mit einem Gaschromatographen oder durch direktes Verdampfen der Probenmoleküle geschehen. Im Analysator werden die Ionen durch magnetische oder elektrische Felder unterschiedlichster Geometrie aufgetrennt. Der Detektor ist in modernen Geräten ein Sekundärelektronenvervielfacher. In den Anfängen wurden auch Photoplatten verwendet. Als weiteres Element ist heute eine Datenakquisition mittels PC unumgänglich, bei der aus den Daten ein Spektrum berechnet wird.

### 2.2 Ionisationsverfahren zur Analyse von Biomolekülen

Bei den in der organischen Chemie gängigen Verfahren konnten nur solche Substanzen analysiert werden, die sich unzersetzt verdampfen lassen. Aufgrund der Polarität und Thermolabilität von Oligosacchariden, Proteinen oder Peptiden konnten die klassischen Methoden, wie die Elektronenstoßionisation (EI) oder die chemische Ionisation (CI), nicht angewendet werden. Zur Analyse der biochemisch relevanten Stoffklassen mussten also neue, schonende Ionisationsverfahren entwickelt werden.

Schonende oder „weiche“ Ionisationsverfahren zur Analyse von Biomolekülen sind unterteilt in homogene Ionisationsverfahren und *energy sudden* oder *hot spot* Methoden. Bei den homogenen Verfahren sind die Analytmoleküle keinem Temperaturgradienten ausgesetzt. Hierzu zählen die „Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck“ (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI), das Thermosprayverfahren (TS), die Elektro-Spray-Ionisation (ESI) und die Feld-Desorption (FD). Zur Gruppe der *hot spot* Verfahren gehören die Sekundär-Ionen Massenspektrometrie (SIMS), die Plasma-Desorption (PD), der Beschuss mit schnellen Atomen (*fast atom bombardment*, FAB) sowie die Matrix unterstützte Laserdesorption (*matrix assisted laser desorption ionization*, MALDI)<sup>20</sup>. Ihnen gemeinsam ist die kurzzeitige Erzeugung eines extremen Temperaturgradienten. Für die Biochemie haben sich MALDI und ESI als Ionisationsverfahren etabliert und ein breites Anwendungsspektrum in der Strukturaufklärung von Biomolekülen geschaffen.

### 2.2.1 Fast Atom Bombardment (FAB)

Beim FAB-Ionisierungsprozess<sup>21</sup> werden die Analytmoleküle, die in eine oberflächenaktive, flüssige und schwerflüchtige Matrix (z. B. Glycerin) eingebettet sind, mit einem Primär-Ionenstrahl aus Argon-Atomen beschossen. Die dadurch aus den Analytmolekülen gebildeten Sekundär-Ionen werden im Massenspektrometer analysiert. Die Sekundär-Ionen-Massenspektrometrie (SIMS) wurde zunächst zur Oberflächenanalyse von festen Werkstoffen genutzt<sup>22</sup>. Obwohl sich später zeigte, dass für den Ionisierungsvorgang nicht zwangsläufig Atome nötig waren<sup>23</sup>, hatte sich der Begriff FAB schon etabliert.

Durch die Oberflächenaktivität und den stetigen Beschuss mit einem Ionenstrahl verdampft die Probe und es wird ein intensiver kontinuierlicher Ionenstrahl erhalten, da aus dem Probenarget ständig Analytmoleküle an die regenerierte Oberfläche nachgeführt werden. Die Analytmoleküle müssen in der viskosen Matrix molekular gelöst sein. Bevorzugt entstehen einfach geladene Molekül-Ionen<sup>24</sup>, sowie metallkationische Molekül-Ionen (z. B.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ). Die Ionisierungseffizienz kann durch Zugabe von Alkalisalzen noch erhöht werden.

In der Modellvorstellung der FAB-Ionisation entstehen durch den Primärpartikel-Beschuss (Energie der Partikel mehrere keV) 150 Å tiefe Krater (*impact cavities*) auf der Matrixoberfläche. Die kinetische Energie des Primär-Ionenstrahls wird umgesetzt in die Desorption von Analytmolekülen. Nach kurzzeitiger thermischer Erhitzung (*thermal spike*) sinkt die innere Energie, da für die Überführung der Analytmoleküle ins Vakuum (*supersonic jet*) die intermolekularen Wechselwirkungen mit der Matrix überwunden werden müssen. Im Übergangsbereich zwischen Matrix und Vakuum (*selvedge region*) herrscht ein hoher Druck (Teilchendichte). Durch die kurze mittlere freie Weglänge, die den Analytmolekülen bleibt, erleiden diese viele Stöße. Dadurch sinkt ihre Energie, so dass sie nahezu unzersetzt desorbiert werden. Der geringe Energieüberschuss führt zur Ionisierung der Analytmoleküle in der Gasphase als Quasi-Molekül-Ionen ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $([\text{M}-\text{H}]^-)$ ).

### 2.2.2 MALDI-Ionisationsprozess

Grundlage beim MALDI-Prozess als *energy sudden* Methode ist der gepulste Laserbeschuss einer festen, kristallinen und UV-Strahlung absorbierenden Matrix (siehe Abbildung 1), in der die Analytmoleküle eingebettet sind. Durch die Laserenergie werden die Proteinmoleküle mit der verdampfenden Matrix in die Gasphase überführt und ionisiert. Die Matrix absorbiert überschüssige Energie und verhindert so eine Zersetzung der Analytmoleküle.

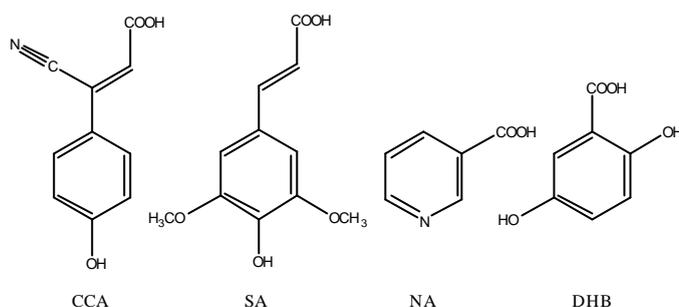


Abbildung 1: Matrizes für MALDI;  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (CCA), Sinapinsäure (SA), Nikotinsäure (NA), Dihydroxybenzoesäure (DHB).

Als Matrix werden niedermolekulare, leicht zu kristallisierende Substanzen benutzt, deren Absorptionsmaximum (siehe Tabelle 2) im Wellenlängenbereich des verwendeten Lasers (siehe Tabelle 1) liegt. Typischerweise wird ein Stickstofflaser ( $\lambda=337\text{nm}$ ) benutzt. In jüngster Zeit werden auch IR-Laser verwendet, deren Wellenlängen im  $\mu\text{m}$  Bereich liegen<sup>25</sup>.

Tabelle 1: Laser, die in der MALDI-MS verwendet werden; Der  $\text{CO}_2$  und der Er:YAG-Laser emittieren Licht im infraroten Bereich (IR-MALDI).

Laser	Wellenlänge	Photonenenergie	Pulsdauer
		[eV]	[ns]
$\text{N}_2$	337 nm	3,68	< 1 bis einige ns
Nd:YAG ´ 3	355 nm	3,49	5
Nd:YAG ´ 4	266 nm	4,66	5
Er:YAG	2,94 $\mu\text{m}$	0,42	85
$\text{CO}_2$	10,6 $\mu\text{m}$	0,12	100

Tabelle 2: typische Matrizes für MALDI-MS in der biochemischen Analytik; Die Wellenlängen sind die Absorptionsmaxima der Matrizes.

Matrix	Wellenlänge	geeignet für
Nicotinsäure	266 nm	Proteine, Peptide
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)	266 nm, 337nm, 355 nm	Proteine, Peptide
3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (Sinapinsäure)	266 nm, 337nm, 355 nm	Proteine
$\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure	337 nm, 355 nm	Peptide
4-Hydroxypicolinsäure	337 nm, 355 nm	Oligonucleotide
Bernsteinsäure	2,94 $\mu\text{m}$ , 10,6 $\mu\text{m}$	Proteine, Peptide
Glycerin	2,94 $\mu\text{m}$ , 10,6 $\mu\text{m}$	Proteine, Peptide

Der eigentliche Ionisationsprozess wird noch widersprüchlich diskutiert<sup>26 27 28 29</sup>. Ausgehend von einer Kokristallisation der Analytmoleküle in der UV-absorbierenden Matrix erfolgt die Anregung des Kristallgitters der Matrix. Durch die plötzliche, lokale Energiezufuhr (*pressure pulse*)<sup>30</sup> entsteht ein Druckgradient gegenüber der Targetoberfläche, so dass die Beschleunigung der Matrixmoleküle die Proteinmoleküle mit in die Gasphase reißt. Als Ursache für den Druckgradienten werden Coulombwechselwirkungen, angeregte Sekundärelektronen niedriger Energie, sublimierende Matrixmoleküle und abstoßend wirkende Zerfallsreaktionen der Matrix angesehen.

Nach der „Flaschenhalstheorie“ (VERTES<sup>31</sup> et. al.) wird die elektronische Energie der Photonen durch die Matrix in Schwingungsenergie umgewandelt. Durch die hohe Energiedichte werden für kurze Zeit ( $t < 20$  ns) hohe Temperaturen von über 1000s°C erreicht. Es kommt zur Sublimation und Desorption der Matrixmoleküle. Aufgrund der großen Anzahl von Schwingungsfreiheitsgraden in einem Protein können die Schwingungen der Matrix nicht auf die Proteinmoleküle übertragen werden, so dass diese nahezu unzerstört in die Gasphase sublimieren können.

Es konnte beobachtet werden, dass die Geschwindigkeitsverteilung von Teilchen unterschiedlichen Molekulargewichts nach der Desorption ohne beschleunigendes Feld zunächst gleich ist. Daraus wird geschlossen, dass sich bei der Desorption sowohl Analyt als auch Matrix mit Überschallgeschwindigkeit (*supersonic particle beam*) von der Targetoberfläche entfernen.

In der MALDI-Massenspektrometrie werden bevorzugt einfach geladene Molekül-Ionen beobachtet. Auf die Frage nach dem Grund wird die Theorie der „glücklichen Überlebenden“ (*lucky survivors*) aufgestellt (KARAS et al.)<sup>32</sup>. Durch den Laserbeschuss entstehen zunächst hochgeladene Cluster-Ionen aus Analyt- und Matrix-Molekülen, die in die Gasphase desorbieren. Die Cluster besitzen einen Überschuss an Elektronen, welcher von der Matrix aufgefangen, oder aber in das Vakuum abgegeben wird. Die Elektronen und die protonierte Matrix sorgen in einem Reutralisationsprozess dafür, dass aus den hochangeregten Clustern durch den Verlust von ungeladenen Matrix-Molekülen einfach geladene Analytteilchen entstehen.

### 2.2.3 Elektro-Spray-Ionisationsverfahren (ESI)

Der Ionisationsprozess, der dem ESI zu Grunde liegt, gehört zu den homogenen Ionisationsverfahren. Über eine Stahlkapillare an der ein elektrisches Feld anliegt, werden die gelösten Analytmoleküle in die Ionisationskammer „gesprüht“ und ionisiert.

Makroskopisch (siehe Abbildung 2) betrachtet entsteht am Ende der Kapillare ein Spray-Kegel (TAYLOR-Konus), der sich zu einem Flüssigkeitsfilament aus vielen Tröpfchen verzweigt. Aus diesem Filament bilden sich bei Überwindung der Oberflächenspannung viele kleine Tröpfchen. Dieser Flüssigkeitsstrom verbreitert sich durch die Luftverwirbelungen zu einem Tröpfchennebel,

aus dem durch Verdampfung der Lösemittelmoleküle desolvatisierte Ionen entstehen. Diese sind im Gegensatz zum MALDI-Prozess mehrfach geladen.

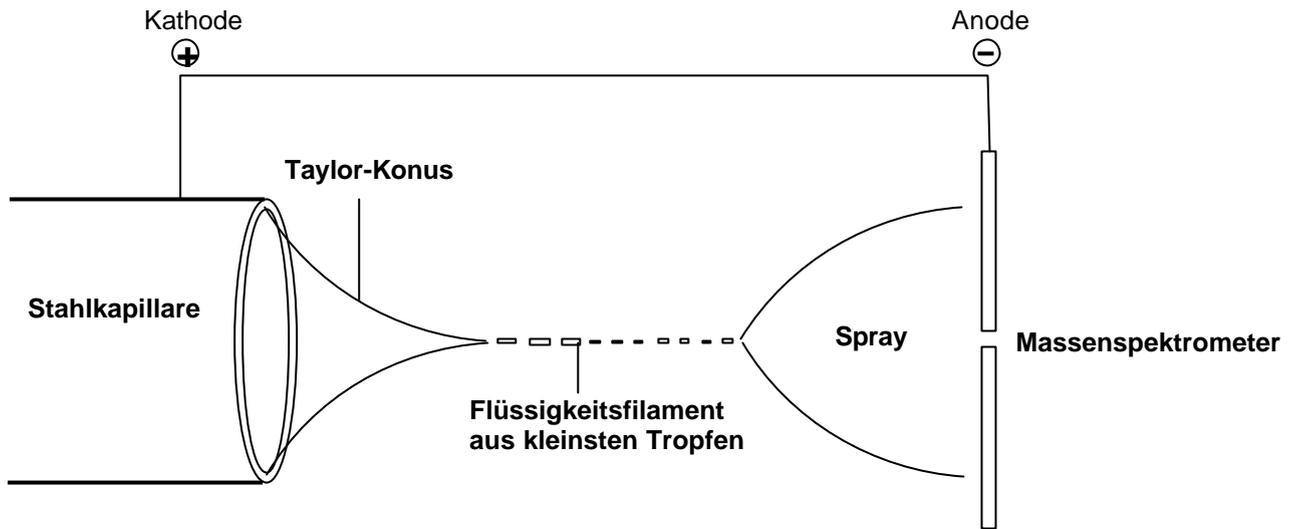


Abbildung 2: Makroskopischer ESI-Ionisierungsprozess zur Erzeugung positiv geladener Molekül-Ionen; Zwischen der Stahlkapillare und dem Einlass zum Massenspektrometer liegt eine Gleichspannung (2-8 kV) an; Zur Erzeugung negativ geladener Molekül-Ionen muss die Spannung umgepolt werden.

Mikroskopisch betrachtet lässt sich der Ionisationsprozess in vier Schritte unterteilen:

- Bildung kleiner hoch geladener Elektrolyttröpfchen
- Abnahme des Tröpfchendurchmessers durch Verdampfen von Lösemittelmolekülen unter Erhöhung der Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche
- Abgabe kleiner hoch geladener Tröpfchen
- komplette Desolvatisierung der Analytmoleküle

Die aus der leitfähigen Kapillare strömende Flüssigkeit wird im elektrischen Feld entsprechend der Ladung der einzelnen Moleküle beeinflusst (siehe Abbildung 3). Bei der Messung positiver Ionen wird die Spannung so angelegt, dass die positiv geladenen Analytmoleküle in Richtung des Massenanalysators beschleunigt werden. Durch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit und die Beschleunigung negativ geladener Teilchen in Richtung der Kapillare bildet sich am Ende der Kapillare ein sogenannter *Taylor-Konus* aus. Wenn die anliegende Spannung ausreichend hoch ist und die Oberflächenspannung überwunden werden kann, wird aus der Spitze des Flüssigkeitskonus kontinuierlich ein filamentartiger Flüssigkeitsstrom emittiert. Dabei werden Mikrotröpfchen gebildet, in denen aufgrund der elektrophoretischen Ladungstrennung ein Überschuss an positiven Ladungen herrscht. Die Stabilität dieser Tröpfchen kann über die Rayleigh-Gleichung beschrieben werden. Ein Tropfen ist so lange stabil, wie die Ladung  $Q$  die Oberflächenspannung  $g$  ausgleicht. Unterschreitet der Tröpfchenradius die kritische Grenze durch Desolvatation, so kommt es durch die Abstoßung der gleichen Ladungen zu Coulomb-Explosionen.

$$Q^2 = 64 \cdot p^2 \cdot e_0 \cdot g \cdot r^3$$

$r$ : Radius des Tropfens

$\epsilon_0$ : Dielektrizitätskonstante im Vakuum

Für die eigentliche Bildung der Gasphasen-Ionen wurden zwei theoretische Modelle entwickelt. Die ältere von DOLE<sup>33</sup> und RÖLLGEN wird als *charged-residue model* (CRM) bzw. als *single ion in droplet theory* (SIDT) bezeichnet. Die Theorie geht davon aus, dass durch eine Reihe von Coulombexplosionen extrem kleine Tröpfchen mit einem Radius von 1 nm gebildet werden, welche lediglich ein Analytmolekül enthalten. Durch Kollisionen mit Stickstoffmolekülen auf dem Weg in den Massenanalysator werden diese Tropfen dann vollständig desolvatisiert.

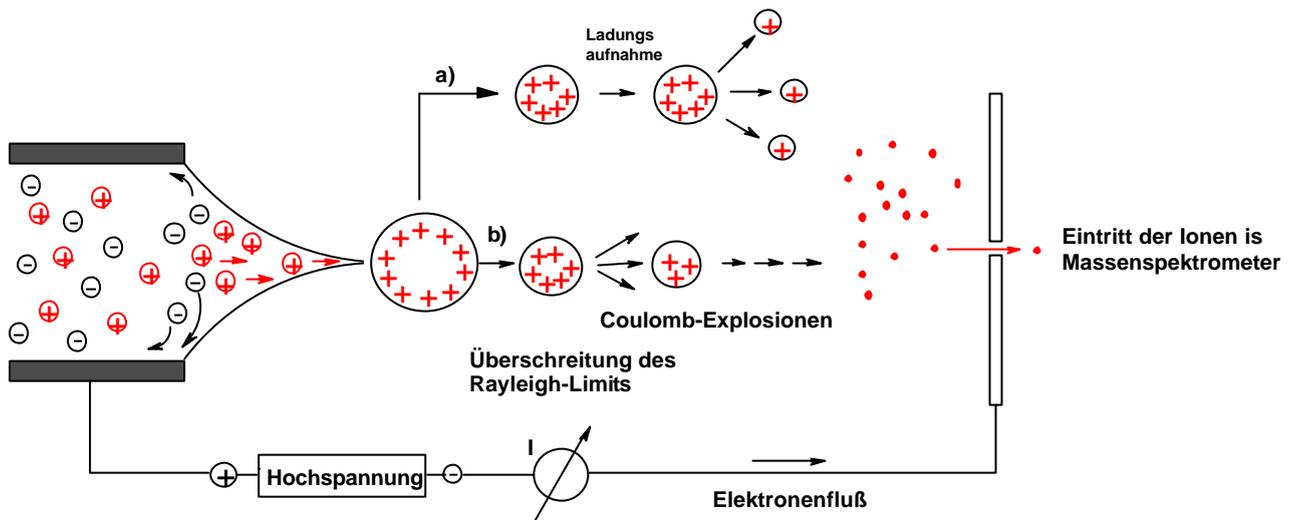


Abbildung 3: Mikroskopische Prozesse der Ionenbildung bei ESI<sup>34</sup>, a) kontinuierliche Ionen-Emission, Ionen-Emissionsmodell IEM b) Coulombexplosionen die zu extrem kleinen Tröpfchen führen, aus denen genau ein Analytmolekül emittiert wird, Charge-Residue-Modell.

Das von IRIBANE<sup>35</sup> und THOMSON<sup>36</sup> entwickelte Ionen-Emissionsmodell (*ion evaporation model*, IEM-Theorie) geht von hochgeladenen Tröpfchen (8 nm Durchmesser, 70 Analytmoleküle) aus, die noch oberhalb des Rayleigh-Limits liegen. Durch die Coulombabstoßung nehmen die Ladungen an der Oberfläche des Tropfens eine äquidistante Lage ein. Die Dichte der Ladungen ist an der Oberfläche extrem hoch. Die an der Oberfläche lokalisierten hochgeladenen Analytmoleküle emittieren aus dem Tropfen in die Gasphase (*micro fissions*). Die kontinuierliche Emission wird durch die gleichzeitige Verdampfung von Lösemittelmolekülen aufrechterhalten.

Dabei ist für den Ladungszustand des Analyten dessen räumliche Größe entscheidend<sup>37</sup>. Je größer das Analytmolekül unter der Oberfläche des Mikrotropfens ist, desto mehr Ladungen wird er beim Austritt in die Gasphase mitnehmen. Peptide mit einer Größe von < 1000 Da treten nur einfach geladen auf, wohingegen Peptide mit einem Molekulargewicht > 2000 Da ausschließlich mehrfach geladen sind.

Für beide Theorien gibt es experimentelle Befunde<sup>38</sup>. So lässt sich über die IEM-Theorie die bei Proteinen beobachtete Ladungszustandsverteilung erklären. Durch den abnehmenden Tröpfchenradius unter Ladungserhalt wird die Ladung pro Analytmolekül kontinuierlich größer. Ionen, die

von kleineren Tröpfchen emittieren haben somit einen höheren Ladungszustand als solche, die am Anfang des Desolvatisierungsprozesses entstehen. Die Intensität der hohen Ladungszustände strebt dabei einem Maximalwert zu. Die umhüllende Kurve der Ladungsverteilung ähnelt einer Boltzmannverteilung (siehe Abbildung 4). Für das Modell bedeutet dies, dass die Ionen bis zu einem minimalen Durchmesser der Tröpfchen emittieren und somit einen maximalen Ladungszustand erreichen.

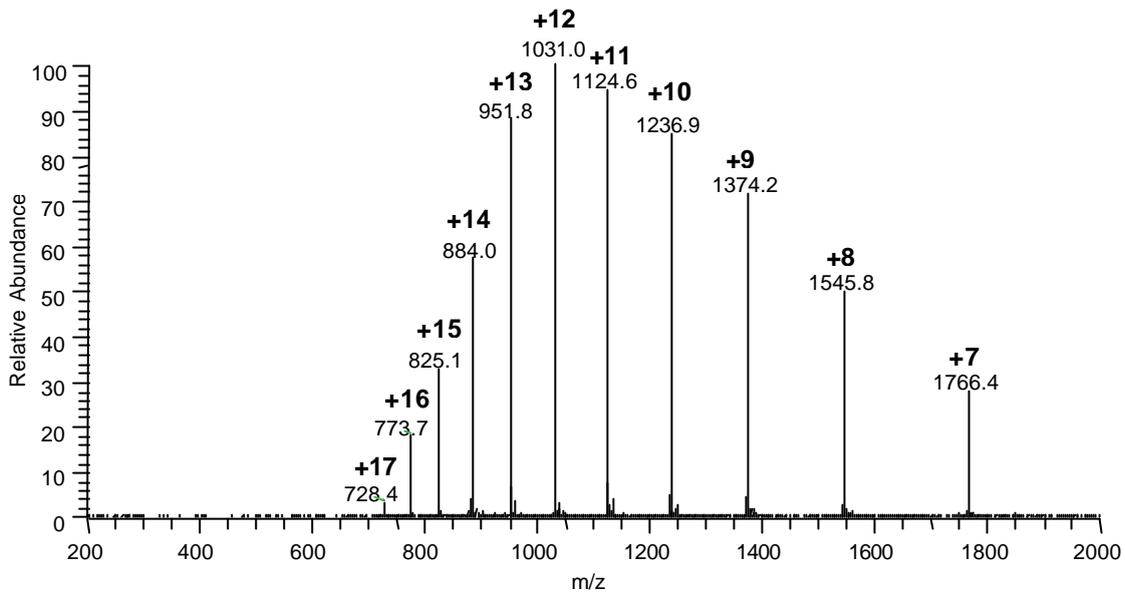


Abbildung 4: ESI-MS Spektrum von Cytochrom C (Mol.-Gew.: 12360.09 Da (theor.)), Nach Dekonvolution des Spektrums ergibt sich ein Molekulargewicht von 12359 Da. Die Zahlen über den einzelnen Peaks geben den Ladungszustand des Molekül-Ions an (m/z 1031 ist 12fach geladen).

Je nach Zustand des Proteins in der Lösung werden unterschiedliche maximale Ladungszustände beobachtet. Diese lassen sich ebenfalls mit dem IEM-Modell gut beschreiben. MARTENS<sup>39</sup> konnte so Renaturierungszustände des KeratinozytenWachstumsfaktorRezeptor (KGFR) belegen. Durch Reduktion von Disulfidbrücken wurde die Tertiärstruktur des Proteins destabilisiert, wodurch das Protein teilweise entfaltet wurde. Dieser Prozess geht einher mit einer Vergrößerung der Oberfläche des Proteins, die durch einen erhöhten Protonierungsgrad nachgewiesen werden. Die Proteine nehmen eine räumlich ausgedehnte größere Struktur (*random coil*) ein. Dadurch erhöhte sich der maximale Ladungszustand.

KONERMANN<sup>40</sup> untersuchte an Lysozym und Ubiquitin Faltungszustände. Anhand unterschiedlicher Ladungsverteilungen, die er auf die Unterschiede in den exponierten Proteinoberflächen zurückzuführen sind, konnten die Einflüsse von Methanol und pH-Wert auf den Faltungszustand von Cytochrom C aufgeklärt werden<sup>41</sup>. Im nativen Zustand wurden drei definierte Ladungszustände (10+, 9+, 8+) detektiert. Nach Denaturierung wurde eine erhöhte Anzahl von Ladungszuständen

(19+ bis 10+) gefunden. Somit ist ESI-MS auch in der Lage dreidimensionale Strukturinformationen zu liefern.

## 2.3 Analysatoren

Zur Analyse erzeugter Ionen werden Sektorfeldgeräte, Quadrupolsysteme, elektrische (*ion-trap*) oder magnetische (Ionenzyklotron-Resonanz-Zelle, ICR) Ionenfallen und Flugzeitmassenspektrometer (*time-of-flight*, TOF) benutzt. Für die Peptidanalytik ist neben der schon beschriebenen schonenden Ionisation die Möglichkeit zur Fragment-Ionenanalyse wichtig.

### 2.3.1 Flugzeitmassenspektrometrie (*time of flight*, TOF)

Die bei der MALDI-Ionisation am häufigsten eingesetzten Massenanalysatoren sind die Flugzeitmassenspektrometer oder TOF-Analysatoren<sup>42</sup>, da sie für die Messung gepulster Ionenströme ideal sind und eine gute Auflösung erreichen. Die Ionen werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt. Bei gleicher kinetischer Energie besitzen die Teilchen aufgrund unterschiedlicher Masse unterschiedliche Geschwindigkeiten, so dass im feldfreien Raum (*drift zone*) die Ionen mit geringer Masse zuerst detektiert werden (siehe Abbildung 5). Die im Hochvakuum gemessenen Flugzeiten der Ionen sind proportional zu ihrem Molekulargewicht. Die typischen Flugzeiten in einem TOF-Gerät liegen im Bereich von 1  $\mu\text{s}$  bis 100  $\mu\text{s}$  über eine Driftstrecke von 1 bis 4 m. Durch die Pulsung des Lasers können innerhalb kürzester Zeit mehrere Einzelspektren (*shots*) summiert werden, um so das Signal Rausch-Verhältnis zu verbessern.

#### 2.3.1.1 Lineares Flugrohr (lin-TOF)

Durch den Laserbeschuss werden die Analytmoleküle in die Gasphase gebracht und ionisiert (siehe Ionisationsverfahren). Die Laserleistung wird über eine mit Ruß bedampfte Scheibe abgeschwächt (*attenuation*) und muss so justiert werden, dass sie gerade über der Schwelle (*threshold*) der Matrixionisation liegt. Für Analytmoleküle, die höhere Laserleistungen benötigen, gibt es noch die Möglichkeit, eine Potentialschwelle anzulegen, die verhindert, dass Ionen bis zu einer bestimmten Masse (*cut-off-mass*, z. B. 1000 Da) den Detektor erreichen.

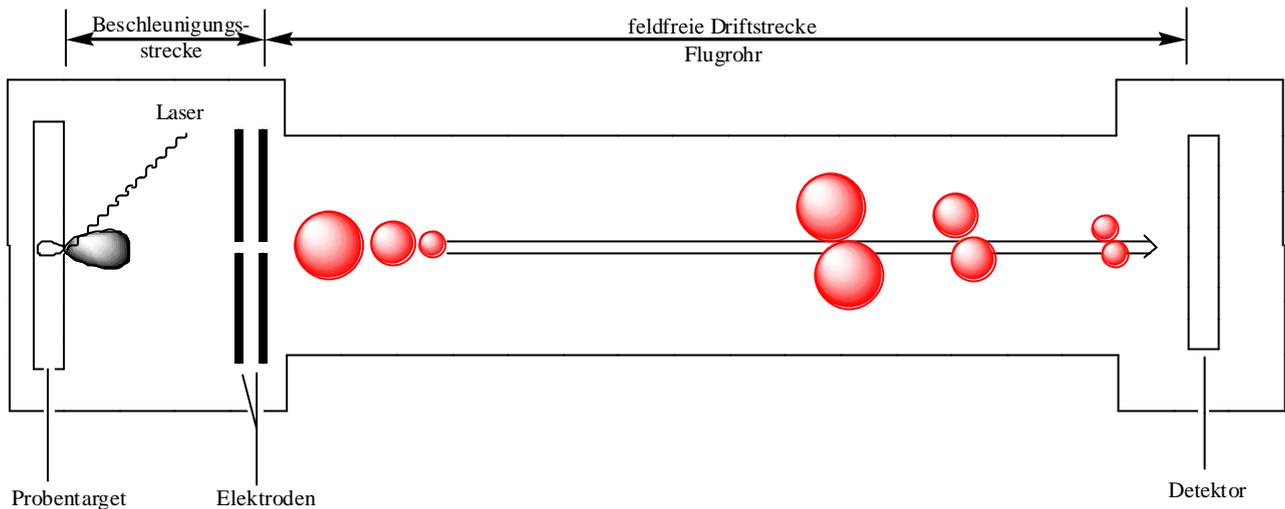


Abbildung 5: Skizze eines linearen Flugzeitmassenspektrometers mit MALDI-Ionenquelle<sup>43</sup>, Die Ionen treten zum gleichen Zeitpunkt in das Flugrohr ein. Die kleinen Ionen fliegen bei gleicher kinetischer Energie schneller als die großen Ionen.

Durch das angelegte elektrostatische Feld werden die Ionen in Richtung der Elektroden beschleunigt. Beim Eintritt in das eigentliche Flugrohr besitzen alle Ionen theoretisch die gleiche kinetische Energie ( $E_{kin}$ ):

$$E_{kin} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = z \cdot e \cdot U$$

$m$  = Masse des Ions

$v$  = Geschwindigkeit des Ions nach der Beschleunigungsstrecke

$z$  = Ladungszahl

$U$  = Spannung

$e$  = Elementarladung

Die Geschwindigkeit ( $v$ ), mit der die Ionen durch das Flugrohr driften, ist gleich der zurückgelegten Strecke ( $L$ ) pro Zeit ( $t$ ). Somit ergibt sich durch Einsetzen in obige Gleichung:

$$\frac{1}{2} \cdot m \cdot \left(\frac{L}{t}\right)^2 = z \cdot e \cdot U$$

Um die unbekannte Masse bzw. das Verhältnis von Masse zu Ladungszustand zu berechnen, wird die Gleichung noch umgeformt:

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot e \cdot U}{L^2} \cdot t^2$$

Die Masse ist proportional zum Quadrat der Zeit. Größere Ionen erreichen bei gleicher Ladung nach den kleineren Ionen den Detektor, da diese bei gleicher kinetischer Energie eine größere Geschwindigkeit besitzen.

Für die Messung von Proteinen ist die Auflösung von entscheidender Bedeutung. Das Auflösungsvermögen  $R$  (*resolution*) ist definiert als der Quotient aus der Masse  $m$  und der Differenz ( $\Delta m$ ), mit der ein weiteres Ion der Masse  $m + \Delta m$  von  $m$  unterschieden werden kann.

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{m_1}{(m_2 - m_1)}$$

Für Quadrupolanalysatoren sind zwei Ionen getrennt, wenn sie auf der Hälfte ihrer Intensität unterscheidbar sind. Das bedeutet nicht, dass bei einem Auflösungsvermögen von 1000 die Peaks der Massen 1000 und 1001 auch tatsächlich voneinander getrennt werden können. Vielmehr überlappen beide Peaks zu einem gemeinsamen Signal, so dass die sichtbare Auflösung im Spektrum wesentlich geringer ist. Deshalb wird bei Flugzeitmassenspektrometern das Auflösungsvermögen traditionell über die Halbwertsbreite FWHM (*full width at half maximum*) eines monoisotopischen Peaks bei 50 % der Gesamtpeakhöhe definiert.

Die Bildung der Ionen in der Gasphase erfolgt beim MALDI-Prozess nicht gleichzeitig. Es entsteht immer eine Wolke aus Matrix und Analytmolekülen, so dass nicht alle Teilchen mit der gleichen Geschwindigkeit aus der Matrix austreten. Moleküle mit gleichem  $m/z$  Verhältnis unterliegen somit einer gewissen Energie-, Orts- und Zeitunschärfe, was das Signal verbreitert und somit die Auflösung vermindert. Zur Kompensation dieser Ionisationseffekte wurde das Verfahren der verzögerten Ionenextraktion (*delayed extraction*<sup>44</sup>, DE bzw. *post-ionization extraction*, PIE) entwickelt. Das elektrische Feld wird nicht permanent, sondern zeitversetzt (*ns*-Bereich) zum Laserpuls eingeschaltet. Dadurch erfahren die gebildeten Ionen je nach ihrer Entfernung vom Target eine unterschiedliche kinetische Energie, d. h. die Ionen, die bis zum Einschalten des Beschleunigungsfeldes weiter in den Raum geflogen sind, werden nicht so stark beschleunigt wie die Ionen in der Nähe des Targets. Durch die Verzögerungszeit lassen sich die Effekte so kompensieren, dass die Flugzeitverteilung der Ionen am Ort des Detektors minimal ist (Erhöhung der Auflösung).

Das eigentliche Detektionssystem für Ionen ist ein Sekundär-Elektronenvervielfacher (SEV). An einer auf hohem Potential liegenden Konversionsdynode (10 kV mit entgegengesetzter Polarität) wird durch die auftreffenden Ionen eine Elektronenkaskade ausgelöst. Das Signal wird als Strom gemessen und digitalisiert.

### 2.3.1.2 Reflektor Flugrohr (re-TOF)

Um die Auflösung von Flugzeitmassenspektrometern weiter zu erhöhen, kann über einen Reflektor der bei der Ionisation auftretende Unterschied in der kinetischen Energieverteilung der Ionen gleicher Masse minimiert werden. Der Reflektor besteht aus Reflektor-Elektroden mit entgegengesetztem Potential, die ein elektrostatisches Feld am Ende der feldfreien Driftzone

aufbauen. In einer parabolischen Bahn dringen die Ionen mit höherer kinetischer Energie geringfügig tiefer in das Reflektorfeld ein (siehe Abbildung 6) als die langsameren Ionen mit einem gleichen Masse/Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ). Durch die unterschiedliche Länge der Flugbahnen werden die Unterschiede der kinetischen Energien ausgeglichen.

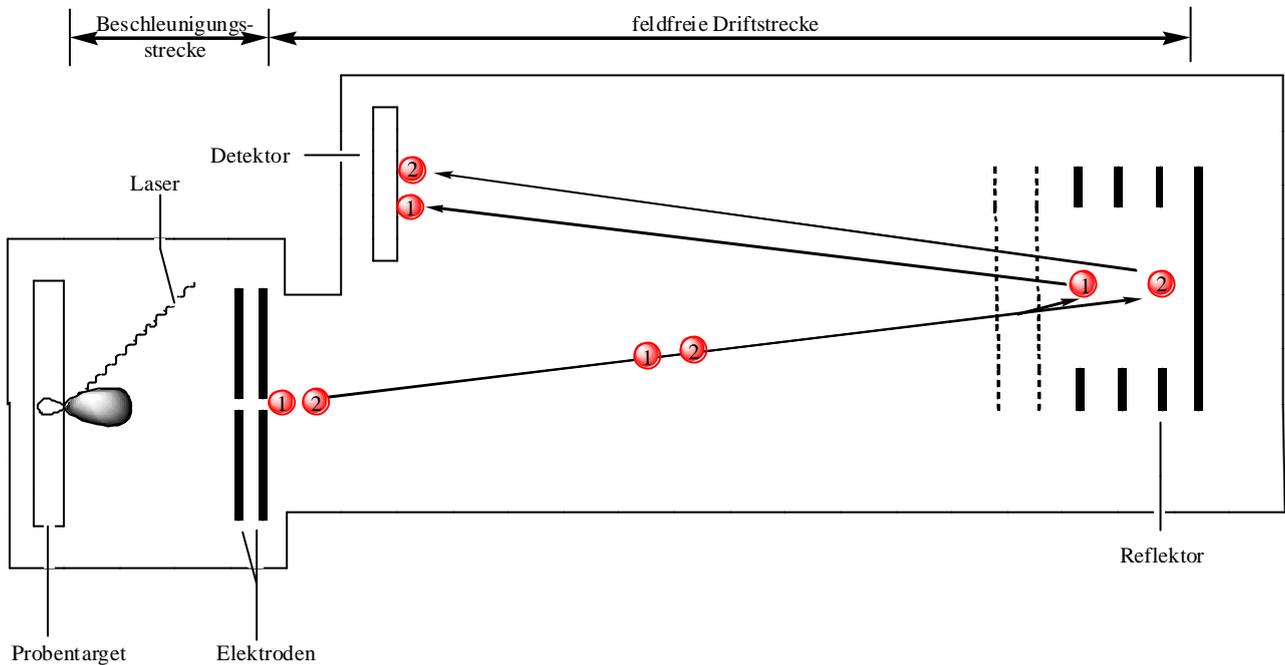


Abbildung 6: Re-TOF Massenanalysator<sup>45</sup>; Die Ionen (1 und 2) besitzen gleiche  $m/z$ , aber 2 hat eine geringfügig erhöhte kinetische Energie, so dass es vor 1 im Reflektor ankommt. Durch die unterschiedlichen „Eintauchtiefen“ in den Reflektor muss 2 eine längere Strecke zurücklegen als 1, so dass beide nahezu gleichzeitig am Detektor ankommen.

Dabei ist je nach Reflektionswinkel der Detektor kreisförmig um den Austritt der Ionisationskammer angeordnet. Bei einigen Geräten erreicht der Reflektionswinkel nicht exakt  $180^\circ$ , so dass der Detektor neben der Ionenquelle angebracht ist (siehe Abbildung 6). Moderne Geräte, unter anderem das in der Arbeit benutzte Gerät, arbeiten mit zwei Detektoren, so dass wahlweise im linearen oder im Reflektor-Modus gemessen werden kann. Neueste Entwicklungen ermöglichen sogar eine mehrmalige Reflexion der Ionen um  $180^\circ$ , so dass die Ionen eine längere Strecke im Flugrohr zwischen zwei Reflektorfeldern zurücklegen können, bevor sie detektiert werden. Mit einem solchen *multiple-reflection* ESI-TOF-MS können Auflösungen  $> 50000$  (FWHM Definition) erreicht werden, die beispielsweise eine monoisotopische Massenbestimmung von *Cytochrom C* ermöglichen<sup>46</sup>.

### 2.3.2 Quadrupol-Analysatoren

Bei einem Quadrupol-Analysator<sup>47</sup> sind vier Metallstäbe mit rundem oder hyperbolischem Profil senkrecht aufeinander und parallel zueinander angeordnet (siehe Abbildung 7). Zwischen den Stäben liegt eine Gleichspannung an, über die ein Wechselfeld moduliert wird, wobei jeweils gegenüberliegende Stäbe die gleiche Polarität der Gleichspannung sowie die gleiche Phase der Wechselfeldspannung besitzen. Bei nebeneinanderliegenden Stäben ist die Phase der Wechselfeldspannung um  $180^\circ$  versetzt und somit die Polarität entgegengesetzt. Die Frequenz des Wechselfeldes liegt im Radiofrequenzbereich. Bei der Analyse eines Ionenstrahls (*scan*) werden gleichzeitig die Gleichspannung und die Amplitude des Wechselfeldes so erhöht, dass ihr Verhältnis konstant bleibt. Die vom Analysator durchgelassenen Ionen bewegen sich auf einer oszillatorischen Bahn. Dabei werden kontinuierlich über einen Messbereich (bis  $m/z$  4000) die Oszillationsbahnen für die Ionen in Abhängigkeit von der Zeit stabilisiert. Zur Hälfte der Zeit, in der ein Spektrum aufgenommen wird, verlassen so nur die Ionen der Masse 2000 (bzw.  $m/z = 2000$ ) den Quadrupol auf einer stabilen Bahn; alle übrigen Ionen werden gegen die Metallstäbe gelenkt und entladen sich dort (Abbildung 7, blaue Flugbahn).

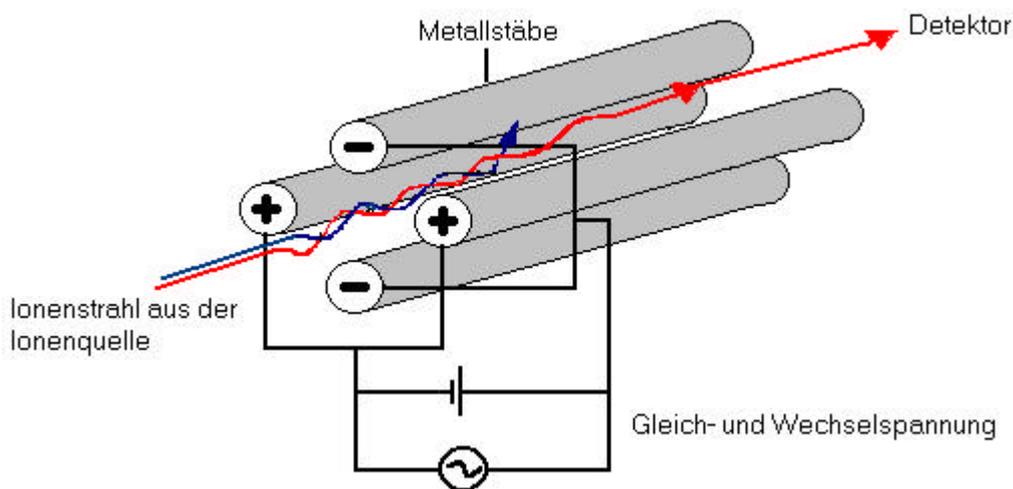


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Quadrupol-Analysators; Rot Flugbahn des resonanten Ions; Ionen, die sich nicht auf stabilisierten Bahnen bewegen (blaue Flugbahn), werden abgelenkt und entladen sich an den Stäben des Quadrupols.

Durch Kombination mehrerer Quadrupole mit dazwischenliegenden Stoßkammern können so MS/MS-Experimente realisiert werden. Nach dem gleichen Prinzip funktionieren Oktapole, die beispielsweise zur Ionenfokussierung vor dem Eintritt in eine Ionenfalle benutzt werden (siehe Abbildung 25).

### 2.3.3 Elektrische Ionenfalle nach PAUL

Die nach seinem Erfinder benannte Ionenfalle (WOLFGANG PAUL, Nobelpreis für Physik 1989) wurde schon 1960 beschrieben und zum Patent angemeldet<sup>49</sup>. Es dauerte gut 20 Jahre, bis STAFFORD<sup>50</sup> ein modifiziertes und benutzbares Gerät entwickelte. Die elektrische Ionenfalle besteht aus einer ringförmigen Elektrode, die von oben und unten mit einer perforierten Endkappe abgeschlossen wird, durch die Ionen in die Falle ein- und wieder austreten können (siehe Abbildung 10). Die Ionenfalle wirkt im Prinzip wie ein „kreisförmiger“ Quadrupol, arbeitet aber diskontinuierlich. Ionen werden erst in die Falle hineingelassen, gespeichert und beim Austreten analysiert.

Über ein an der Ringelektrode angelegtes

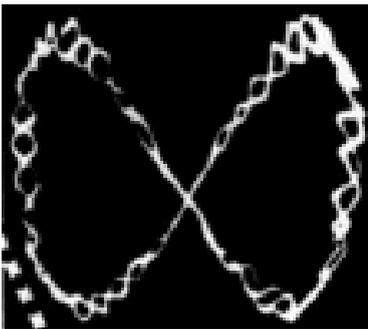


Abbildung 8: „Lissajous“-Figur.

Hochfrequenzfeld können zunächst Ionen über einen großen Bereich ( $m/z$  4000) auf einer Kreisbahn, die in ihrer Form durch „Lissajous“-Figuren beschrieben werden können (Abbildung 8), stabilisiert werden. Helium mit einem Druck von  $3 \cdot 10^6$  bar als Hilfsgas bremst die Ionen in ihrer Geschwindigkeit ab und erhöht somit die Stabilität der Ionen im Inneren der Ionenfalle. Für die Ionen im Inneren der Ionenfalle gilt das Stabilitätsdiagramm

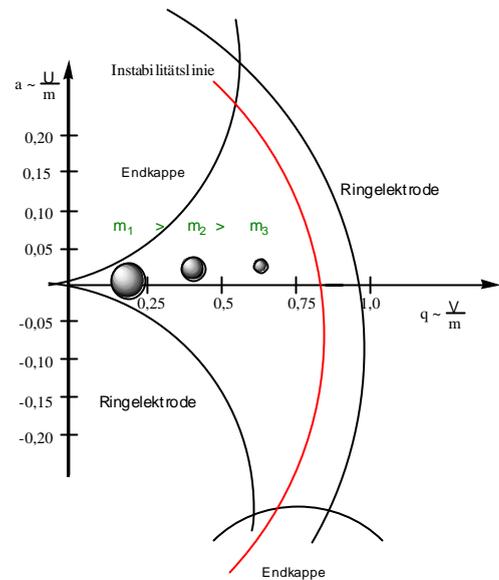


Abbildung 9: Stabilitätsdiagramm der Mathieu-schen Gleichungen für die Ionenfalle<sup>48</sup>.

(Abbildung 9) aus der Lösung der Mathieu-schen Gleichungen, die

beschreiben, unter welchen angelegten Spannungen die Ionen in der Ionenfalle stabil sind. Der Unterschied zum Quadrupol liegt in dem erweiterten Stabilitätsbereich für die Ionen.

Durch kontinuierliche Modifikation der Amplitude (Erhöhung der Spannung) des an der Ringelektrode angelegten Wechselspannungsfeldes werden die Kreisbahnen für die Ionen unterschiedlicher Masse sukzessive destabilisiert. Um die *scan*-Rate für die Aufnahme eines Spektrums zu erhöhen, wird zusätzlich ein dipolares Feld zwischen den Endkappen erzeugt. Durch additive Überlagerung des quadrupolaren und des dipolaren Feldes entstehen Felder höherer Ordnung (hexa-, octa-, dodecapole Felder), durch die Ionen resonant Energie aufnehmen können. Mit der Zunahme der Wechselspannungsamplitude  $q$  (siehe Abbildung 9) überschreiten die Ionen schnell die Instabilitätslinie, so dass sie innerhalb kürzester Zeit die Ionenfalle über die Öffnung an der Endkappe verlassen können.

Der Detektor besteht in der Regel aus einem Sekundär-Elektronenvervielfacher (SEV) der am Ende des Trichters eine negative Spannung besitzt, von der die positiv geladenen Ionen angezogen werden. Aus der mit Bleioxid überzogenen Kathode werden bei ausreichend hoher kinetischer Energie der emittierten Ionen Elektronen herausgeschlagen. Diese Sekundärelektronen werden aufgrund des negativen Potentials in den Trichter hinein beschleunigt. Sie erzeugen eine Elektronenkaskade, die dann als Elektronenstrom mit einem Voltmeter als Signal ausgewertet wird.

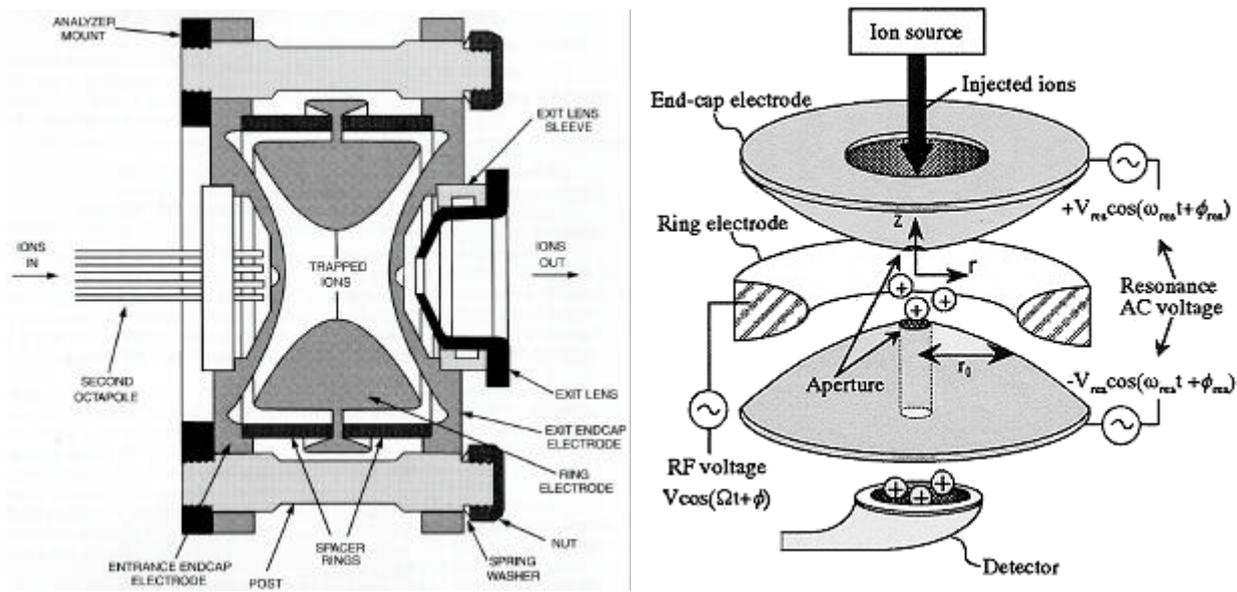


Abbildung 10: Schematischer Aufbau einer Ionenfalle mit fokussierendem Oktapol als Ioneneinlass, die Explosionszeichnung (rechts) zeigt die Ionenfalle um  $90^\circ$  gedreht; der Ioneneinlass ist nun auf der Oberseite, an der Unterseite ist noch der Ionendetektor (SEV) eingezeichnet<sup>51</sup>.

In der Praxis wird ein Vor-Spektrum aufgenommen, aus dem die Zeit ermittelt wird, nötig ist, um eine optimale (vorher festgelegte) Ionenmenge zu isolieren (*automatic gain control*, AGC). Erst dann wird das eigentliche Spektrum aufgenommen, wobei aus üblicherweise drei einzelnen Spektren (*micro-scans*) ein Spektrum (*scan*) addiert wird. Je nach Kontinuität des Ionenstroms und erzeugter Ionenmenge empfiehlt es sich, die Daten mehrerer *scans* über einen bestimmten Zeitraum zu akkumulieren.

### 2.3.4 Magnetische Ionenfalle

Anders als bei der elektrischen Ionenfalle werden die Ionen in einem homogenen Magnetfeld eines supraleitenden Magneten eingefangen. Dazu werden Magnetfelder mit einer Stärke von bis zu 7.4 Tesla eingesetzt, die über ein Ionen-Interface mit der Ionenquelle verbunden sind. Die Analyse der Ionen erfolgt ebenfalls durch resonante Anregung (*Ion Cyclotron Resonance*). Durch die Kombination mit der Fourier-Transform-Technik (FT-ICR)<sup>52</sup> werden hohe Nachweisempfindlichkeiten und Auflösungen<sup>53</sup> im Bereich der biochemischen Analytik (Elementarzusammensetzung von Molekül- und Fragment-Ionen) erzielt. Durch Kopplung des Zyklotrons mit

üblichen Ionisationstechniken (ESI/MALDI) lassen sich besonders mehrfach geladene Peptide/Proteine, aber auch Proteinkomplexe (bzw. Protein/Ligand Wechselwirkungen<sup>54</sup>) wegen des großen Auflösungsvermögens massenspektrometrisch analysieren. Die zur Fragmentierung benötigte Energie wird entweder über Schwarzkörperstrahlung (*Blackbody Infrared Radiative Dissociation*; BIRD oder *Infrared Multiphoton Dissociation*, IRMPD<sup>55</sup>) oder über resonante Anregung der Mutter-Ionen (*Sustained Off-Resonance Irradiation for Collision-Induced Dissociation*; SORI-CID)<sup>56</sup> erzeugt.

## 2.4 Tandem Massenspektrometrie (MS/MS)

Der Begriff Tandem Massenspektrometrie ist historisch zu begründen, da in den ersten Versuchsanordnungen zur Fragment-Ionenanalyse zwei Massenspektrometer mit einer dazwischenliegenden Stoßkammer zur Anwendung kamen. Durch das erste Massenspektrometer werden die Ionen (Mutter-Ionen; Eltern-Ionen, *parent ions* oder Vorläufer-Ionen, *precursor-ions*) für die Fragmentierung isoliert. Durch Stöße mit einem Reaktandgas (Helium, Stickstoff) zerfallen sie in Fragment-Ionen (*fragment ions*; Tochter-Ionen), die dann von einem zweiten Massenspektrometer analysiert werden (siehe Abbildung 11).

Durch die Kopplung weiterer Massenspektrometer können auch noch MS/MS/MS (MS<sup>3</sup>)-Experimente bzw. MS<sup>n</sup>-Experimente realisiert werden. Da die Ionen mit einer kinetischen Energie von 3-10 keV angeregt werden spricht man von Hochenergie-Stoßaktivierung. Niederenergie-Stoßaktivierung (20-200 eV) wird zur Fragmentierung in Quadrupolgeräten oder in Ionenfallen durchgeführt. Die durch Stöße mit einem Reaktandgas bewirkte Fragmentierung wird auch als Kollisions-induzierter Zerfall (*collision induced decomposition*, CID) bezeichnet. Gelegentlich findet auch noch die ältere Bezeichnung des „aktivierten“ Zerfalls (*collision activated decomposition*, CAD) Verwendung.

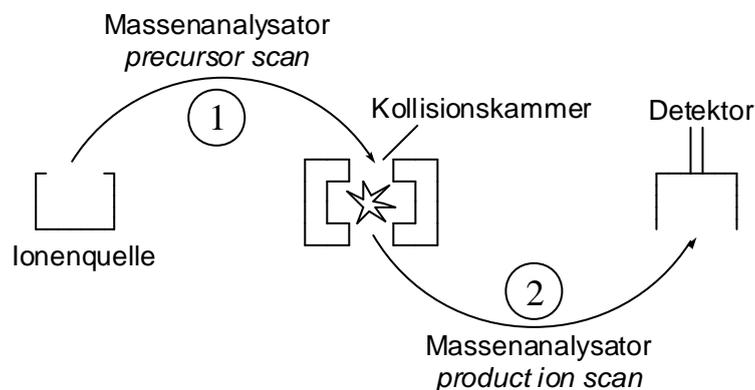


Abbildung 11: Prinzipieller Aufbau eines Tandem-Massenspektrometers (MS/MS-Analyse); 1: magnetisches Sektorfeld (B), 2: elektrisches Sektorfeldgerät (E); zur besseren Ionentransmission besteht die Kollisionskammer aus einem kleinen Quadrupol (q), weshalb diese Anordnung auch BqE abgekürzt wird.

Heutzutage werden Tandem-MS-Experimente durch veränderte aber verwandte Gerätegeometrien realisiert. Am weitesten verbreitet sind Triple-Quadrupol-Geräte (*tripleQuad*), Ionenfallen und Reflektor-Time-of-Flight Instrumente (ReTOF)<sup>57</sup>.

### 2.4.1 Niederenergie-Stoßaktivierung in der Ionenfalle

Der schematische Aufbau und das Funktionsprinzip einer Ionenfalle zur Aufnahme eines Massespektrums wurde an anderer Stelle (siehe Kapitel **Elektrische Ionenfalle**) beschrieben. Für die Durchführung (siehe Abbildung 12) von Tandem-Massespektrometrie-Experimenten<sup>58</sup> werden zunächst die Bedingungen so gewählt, dass eine bestimmte Gesamtintensität an Ionen in der Falle akkumuliert (< 200 ms) wird (A-C). Anschließend werden durch einen Rechteckimpuls die Vorläufer-Ionen isoliert und auf eine stabile Kreisbahn (D) gebracht. Ionen eines bestimmten  $m/z$ -Wertes werden durch die Wechselspannung (1) zwischen den Endkappen und die Hochfrequenzspannung an der Ringelektrode (3) selektioniert bzw. isoliert und auf einer Kreisbahn stabil gehalten. Alle übrigen Ionen sind destabilisiert und entladen sich an den Elektroden (siehe Quadrupol). Durch die geeignete Wahl der Isolationsbreite (*isolation-width*, Massenfenster) können sowohl einzelne Isotopenpeaks als auch der gesamte Isotopenpeak isoliert werden. Die Fragmentierung (F, H) selbst wird durch eine resonante Anregung der isolierten Ionen erreicht.

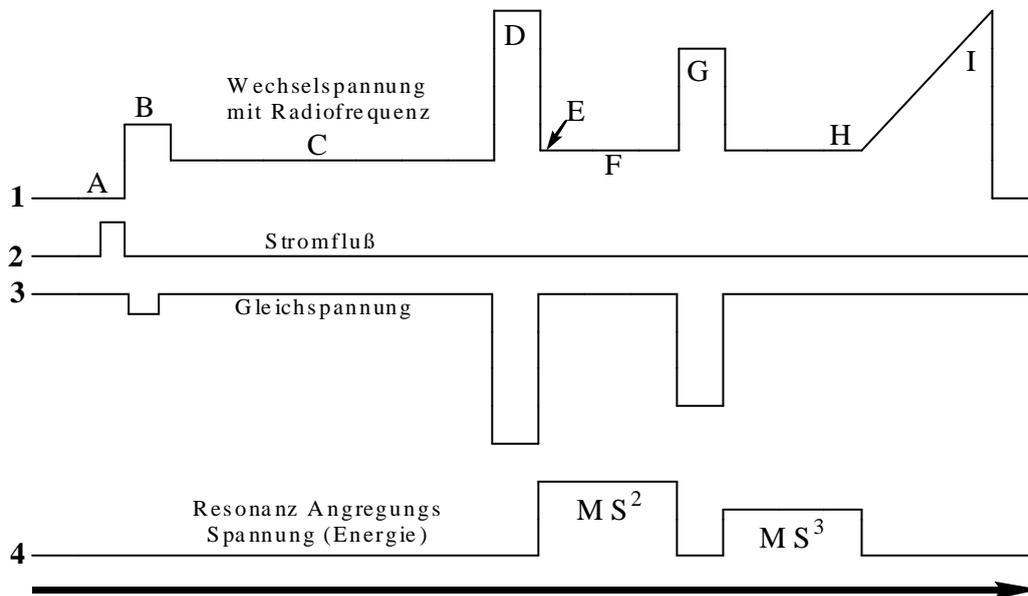


Abbildung 12:  $MS^3$ -Experiment in der Ionenfalle<sup>59</sup>; Schematische Steuerungsskizze der Ionenfalle; A-C Sammeln aller Ionen in der Ionenfalle, D und G: Selektion der Vorläufer-Ionen, F und H: resonante Fragmentierung, I: Aufnahme des Massespektrums.

Die gebildeten Fragment-Ionen des  $MS^2$ -Experiments werden nach der oben beschriebenen Methodik stabilisiert (F). Hier zeigt sich der Vorteil einer Ionenfalle, mit der es möglich ist, den Vorgang der Isolierung (G) und der resonanten Anregung (E) mehrmals bzw. n-fach zu wiederholen. Limitierender Faktor ist dabei die Menge der in der Falle befindlichen Tochter-Ionen. Unterschreitet sie einen bestimmten Wert, nimmt das Signal/Rausch-Verhältnis im aufgenommenen

Massenspektrum zu und die Identifikation von „echten“ Signalen wird unmöglich. Die abschließende Aufnahme des Tochter-Ionenspektrums (I) geschieht durch sukzessive Erhöhung der Wechselspannung (1), die ein normales Massenspektrum der entstandenen Ionen (Fragment-Ionen) erzeugt. Da nach der Selektion des Vorläufer-Ions die Wechselspannung (1) nicht auf den Ausgangswert zurückgestellt wird, sondern auf einen minimal höheren Wert (E), ist die untere Grenze des Fragment-Ionenspektrums auf 27% des  $m/z$ -Wertes des Vorläufer-Ions festgesetzt (27%-Regel).

Dieses gerätetechnisch bedingte Phänomen führt bei der Interpretation von MS/MS-Spektren zu Schwierigkeiten, da bei Vorläufer-Ionen mit großem  $m/z$ -Wert (z. B.  $m/z = 1800$ : Massenbereich nur bis 486) kleine Fragment-Ionen (kleiner als  $m/z$  486) nicht detektiert werden können. Dies führt besonders bei der Sequenzierung der Termini von größeren Peptiden zu Schwierigkeiten, wenn keine großen (mehrfach geladenen) Fragmente entstehen.

#### **2.4.2 In-Source-Fragmentierung**

Diese Fragmentierungsart („in der Quelle“) bezeichnet die Bildung von Bruchstücken bei der Ionisation der Analytmoleküle. Dabei sind diese Prozesse nicht nur auf ESI-Quellen limitiert.

Durch das bei der Elektro-Spray-Ionisation anliegende Potential können unter geeigneten Bedingungen bereits Fragmentierungen auftreten, so dass neben den mehrfach geladenen Molekül-Ionen Fragment-Ionen im MS-Spektrum detektiert werden. Es findet ein „pseudo“ MS/MS-Experiment statt. Bei besonders reinen Analyten kann über eine Erhöhung des Ionisations-Potentials eine Fragmentierung in der Quelle gezielt gefördert werden, um die 27 %-Regel bei Ionenfallen-Stoßexperimenten zu umgehen, so dass auch sehr kleine Fragment-Ionen beobachtet werden können. Die anschliessend detektierten Fragment-Ionen entstehen allerdings aus sämtlichen beobachteten Ladungszuständen der Vorläufer-Ionen, so dass Aussagen über Fragmentierungsmechanismen erschwert bzw. unmöglich sind.

#### **2.4.3 Metastabiler Zerfall bei der MALDI-Ionisation (*Post-Source-Decay*, PSD)**

Zunächst wurde MALDI als sanftes Ionisationsverfahren dazu benutzt, Spektren von intakten Proteinmolekülen zu erhalten. Die Analyse der erzeugten Ionen mittels Flugzeitmassenspektrometrie im linearen Modus zeigte ausschließlich intakte Molekül-Ionen. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Beschleunigung der Ionen in der Ionisationskammer unmittelbar nach der Bildung der Ionen stattfindet. Metastabile Zerfälle im feldfreien Raum können sowohl vom linearen Detektor als auch vom Reflektor nur als Peakverbreiterung detektiert werden, da die Geschwindigkeit der Fragmente, denen der Mutter-Ionen entspricht. Der Nachweis metastabiler Zerfälle in einem linearen-TOF Gerät gelingt durch ein Gitter (siehe Abbildung 13), welches vor dem Detektor ein

Feld mit entgegengesetzter Polarität (Bremsfeld) erzeugt. Das Bremsfeld beschleunigt positiv geladene Teilchen in die entgegengesetzte Richtung ihrer Flugbahn. Neutralteilchen werden durch das Bremsfeld nicht beeinflusst.

Bei Einschalten des Bremsfeldes erreichen nur noch die neutralen Teilchen den Detektor zum gleichen Zeitpunkt wie die Molekül-Ionen bei ausgeschaltetem Bremsfeld. Geladene Fragment-Ionen gelangen nur mit einer Zeitverzögerung auf den Detektor (erscheinen also bei höherem  $m/z$ ) oder werden reflektiert<sup>60</sup>.

Der Anteil der Fragment-Ionenbildung (der metastabilen Zerfälle) ist substanzabhängig (bzw. Matrix-abhängig) und liegt bei 10-50% der zunächst gebildeten Molekül-Ionen<sup>61</sup>. Da die Fragmentierung nicht über ein Kollisionsgas stattfindet, sondern durch den Ionisationsprozess über dem Target, ist das Ausmaß der Fragmentierung stark von der gewählten Matrix abhängig, die in unterschiedlichem Maße die Energie des Laserpulses an die Molekül-Ionen weitergibt oder adsorbiert. Ebenso hat die am Ort der Ionisierung angelegte Feldstärke einen Einfluss auf den Fragmentierungsgrad<sup>61</sup>.

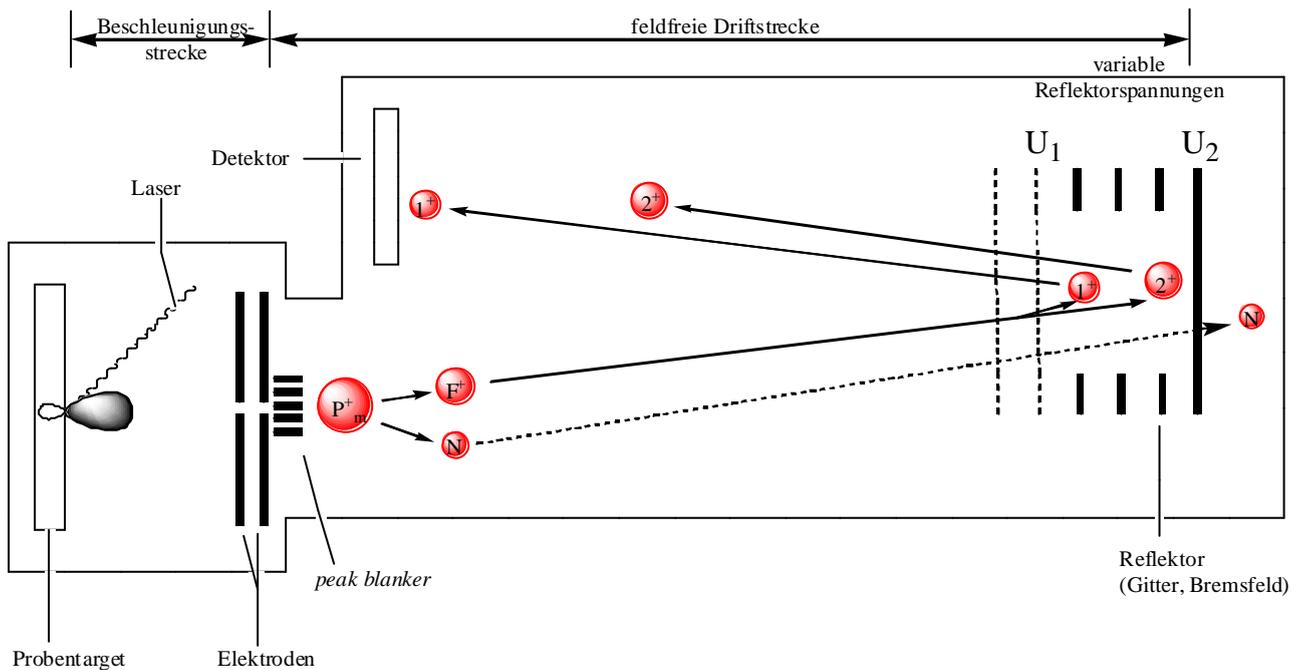


Abbildung 13: MALDI-PSD Prinzip<sup>62</sup>; Molekül-Ionen ( $P_n^+$ ) unterliegen einem metastabilen Zerfall, bei dem nur geladene Fragment-Ionen ( $1^+$ ,  $2^+$ ) am Detektor ankommen; Neutralfragmente ( $N$ ) werden nicht reflektiert. Durch die variablen Reflektorspannungen wird auch die feldfreie Driftstrecke in ihrer Länge beeinflusst.

Erst durch die stufenweise Absenkung des Reflektor-Potentials in einem hochauflösenden Reflektor-TOF<sup>63</sup> kann der metastabile Zerfall entlang der Driftstrecke sichtbar gemacht werden. Ein komplettes PSD-Spektrum umfasst die Aufnahme von ca. 10 bis 15 Einzelspektren, die nach einer Massenkalisierung der Einzelspektren zusammengefügt werden. Die hohe Intensität der Fragment-Ionen gründet auf die relativ große Zeitspanne (30  $\mu$ s bis 300  $\mu$ s), die für den Zerfall zur Verfügung steht. Um die Zerfallsprodukte eines Molekül-Ions selektiv zu erhalten, kommt

unmittelbar nach der Ionenbeschleunigung eine Ablenkungslinse<sup>64</sup> (*peak blanker*, siehe Abbildung 13) zum Einsatz. Ein Rechteckpuls kann aus einem Gemisch von Ionen das gewünschte Molekül-Ion, dessen Fragment-Ionen beobachtet werden sollen, selektionieren.

#### 2.4.4 Fragmentierung von Peptiden

Peptide sind lineare Biomoleküle, die aus sich wiederholenden Struktureinheiten (den Aminosäuren) bestehen. Diese sind durch die Peptidbindung verbunden und unterscheiden sich nur durch die Art der Seitenkette. Durch den bevorzugten Bruch der Peptidbindung, lässt sich eine Reihe von Ionen (*sequence ions*) erzeugen, deren Massendifferenzen (Residuen-Masse, siehe Tabelle 3) einen direkten Rückschluss auf die Aminosäuresequenz zulässt.

Tabelle 3: Residuen-Massen der Aminosäuren<sup>65 66</sup>; Spalte 2 enthält den 3-Buchstaben-Code und Spalte 3 die Ein-Buchstaben-Abkürzung der Aminosäuren; Die mit \* markierten Abkürzungen wurden in dieser Arbeit verwendet.

Aminosäure			Residuen Masse (average)	Residuen Masse (mono)	Immonium Ionen [Da]	Weitere Ionen mit geringer Masse [Da]
Glycin	Gly	G	57.0520	57.0215	30	
Alanin	Ala	A	71.0790	71.0371	44	
Serin	Ser	S	87.0780	87.0320	60	
Prolin	Pro	P	97.1170	97.0523	70	
Valin	Val	V	99.1330	99.0684	72	41, 55, 69
Threonin	Thr	T	101,1050	101,0477	74	
Cystein	Cys	C	103.1440	103.0092	76	
Isoleucin	Ile	I	113.1600	113.0841	86	44, 72
Leucin	Leu	L	113.1600	113.0841	86	44, 72
Asparagin	Asn	N	114.1040	114.0429	87	70
Asparaginsäure	Asp	D	115.0890	115.0270	88	70
Glutamin	Glu	Q	128.1310	128.0586	101	84, 112, 129
Lysin	Lys	K	128.1740	128.0950	101	56, 84, 129
Glutaminsäure	Glu	E	129.1160	129.0426	102	84, 91
Methionin	Met	M	131.1980	131.0405	104	
Histidin	His	H	137.1420	137.0589	110	
Phenylalanin	Phe	F	147.1770	147.0684	120	91
Arginin	Arg	R	156.1880	156.1011	129	70, 87, 100, 112
Tyrosin	Tyr	Y	163.1700	163.0633	136	91,107
Tryptophan	Trp	W	186.2130	186.0793	159	77, 117, 130, 132
Homoserin	Hse		101.1050	101.0477	74	
Homoserin Lacton	Hsl		83.0900	83.0371	56	
Pyroglutaminsäure	Glp		111.1000	111.0320	84	
Carbamidomethylcystein	CAM*		160.1970	161.0307	132	
Carboxymethylcystein	COM*		161.1810	161.0147	133	
Pyridylethylcystein			208.2840	208.0670	181	106

Im Gegensatz zur Edman-Sequenzierung<sup>67</sup>, bei der vom N-Terminus der Peptidkette schrittweise die einzelnen Aminosäuren in Reaktionszyklen abgespalten werden, ist die Massenspektrometrie eine Methode, die nicht auf eine Sequenzrichtung festgelegt ist. Dadurch ergeben sich aber schon erste Schwierigkeiten, denn aus den Abständen zwischen den Ionensignalen einer Serie ist noch nicht automatisch die Richtung der Sequenz abzulesen.

Von den zwanzig in der Natur vorkommenden Aminosäuren gibt es zwei isomere Aminosäuren (Ile und Leu) und zwei isobare Aminosäuren (Gln [Q] und Lys [K]). Diese können aufgrund ihrer identischen Residuenmasse im Niederenergie-Fragment-Ionenspektrum nicht unterschieden werden. Weitere Schwierigkeiten können durch die Aminosäurefolge G-A (57 Da + 71 Da) bzw. A-G (71 Da + 57 Da) entstehen, da die Summe der Residuenmassen der Residuenmasse von Q bzw. K (128 Da) entspricht.

### 2.4.5 Nomenklatur der Fragment-Ionen nach ROEPSTORFF und FOHLMANN<sup>68</sup>

Die hier verwendete Nomenklatur (siehe Abbildung 14) geht von einem Bruch der Peptidbindung aus. Ein  $y$ -Fragment bezeichnet dabei das Bruchstück, welches den ursprünglichen C-Terminus besitzt und in einem neutralen Zustand vorliegt. Durch Hinzufügen von zwei Protonen erhält das Bruchstück dabei nach außen eine formale, positive Ladung, die nötig ist, damit das Fragment im Massenspektrum detektierbar ist. In der ursprünglichen Nomenklatur wird ein solches Ion mit  $y''$  bezeichnet, ein zweifach geladenes  $y$ -Fragment als  $y'''$  oder als  $y^{2+}$ -Fragment.

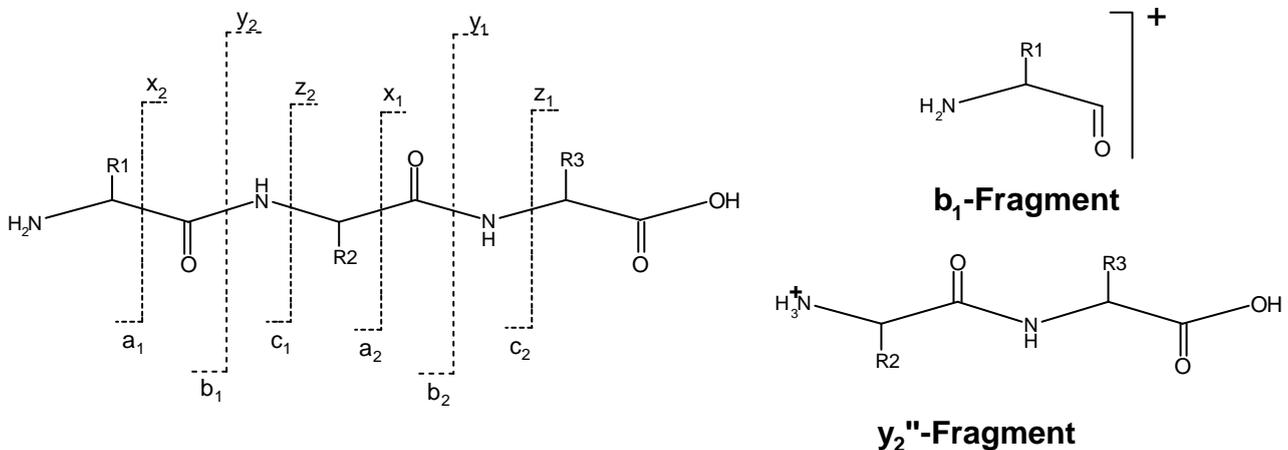


Abbildung 14: Nomenklatur der Fragment-Ionen nach Roepstorff und Fohlmann.

Fragment-Ionen, die den N-Terminus enthalten und eine Ladung tragen werden als  $b$ -Fragmente ( $b^+$ ) bezeichnet. Mehrfach geladene Fragment-Ionen werden mit  $b^{2+}$ ,  $b^{3+}$  und  $b^{4+}$  usw. bezeichnet. Durch Abspaltung der Carbonylgruppe ( $\Delta 28$ ) entstehen weitere Fragment-Ionen. Sie werden der Nomenklatur nach als  $a$ -Fragmente bezeichnet. Häufig erleiden Fragment-Ionen noch Neutralverluste von Ammoniak ( $\Delta 17$ ) oder Wasser ( $\Delta 18$ ). Hier wird die Bezeichnung etwas umständlicher, aber eindeutig (z. B.  $[b_{23} - H_2O]^+$ ). Neutralverluste sind bei der Interpretation von

Fragment-Ionenspektren hilfreich, da sie häufig in einem konstanten Intensitätsverhältnis zu ihren Hauptfragmenten auftreten und so über den Abstand der beiden Ionen (Fragment und Neutralverlust) Rückschlüsse auf den Ladungszustand ermöglichen.

Die tiefgestellte Zahl gibt bei beiden Fragment-Ionen die Nummer der Aminosäure bezüglich des jeweiligen Terminus an. In der vorliegenden Arbeit wird zur eindeutigen Kennzeichnung des Ladungszustandes vereinfachend die Schreibweise mit ganzen, hochgestellten Zahlen verwendet ( $b^{3+}$  und  $b^{2+}$ ). Ein  $y_n$ -Fragment nach der ROEPSTORFF-Nomenklatur wird somit als  $y_n^{2+}$  bezeichnet.

## 2.4.6 Entstehung und Nomenklatur innerer Fragment-Ionenserien

Durch einen intensiven Bindungsbruch in der Peptidkette bei dem die Ladung an dem neu entstandenen „pseudo“-N-Terminus lokalisiert ist, entsteht eine neue Fragment-Ionenserie durch weitere Fragmentierung der Aminosäuren vom originären C-Terminus her (siehe Abbildung 15). Dieser doppelte Bindungsbruch in der Peptidkette führt zu sogenannten inneren Fragment-Ionen.

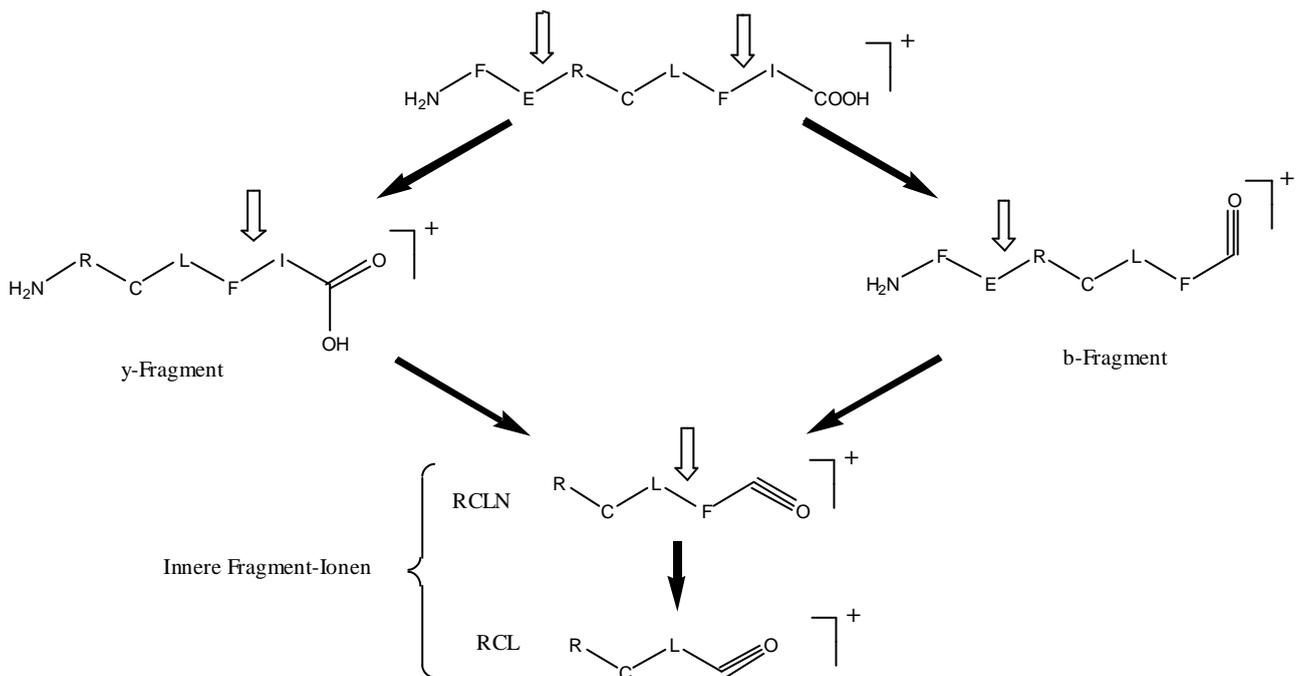


Abbildung 15: Entstehung innerer Fragment-Ionen, die doppelten Bindungsbrüche erfolgen gleichzeitig, Als Schreibweise wird die Ein-Buchstabenabkürzung verwendet.

Das Beispiel geht von zweifach geladenen Molekül-Ionen aus, bei denen eine Ladung am Arginin lokalisiert ist und die zweite Ladung den Bindungsbruch initiiert (siehe 2.4.7.1). Die Signale führen bei der Interpretation von Spektren häufig zu Doppeldeutigkeiten. Als häufig einfach geladene Fragmente liefern sie gut aufgelöste Signale. Innere Fragment-Ionenserien enthalten einen Teil der Sequenz, können mit den Fragment-Ionen der  $b$ - und  $y$ -Serie aber nicht in Einklang gebracht werden.

Innere Fragmente werden durch die Ein-Buchstaben-Abkürzung ihrer Aminosäuren beschrieben (z. B.: RVIHPF). Sie enthalten im Vergleich zu einem intakten Peptid keinen intakten C-Terminus mehr, unabhängig davon, ob sie aus y- oder b-Fragmenten entstanden sind.

### 2.4.7 Fragmentierungsmechanismen einfach geladener Peptide

Die bei einer Fragmentierungsreaktion entstandenen Bruchstücke können nur dann massenspektrometrisch detektiert werden, wenn sie weiterhin eine Ladung besitzen (Ausnahme *neutral loss scan*). Der Verbleib der Ladung entscheidet darüber, welche Ionenserien im Fragment-Ionenspektrum zu sehen sind. Dadurch, dass bei einfach geladenen Vorläufer-Ionen  $[M+H]^+$  nur ein Proton zur Verfügung steht, lassen sich Fragmentierungsmechanismen recht einfach untersuchen und formulieren.

In Deuterium Austauschexperimenten<sup>69</sup> von underivatisierten Peptiden konnte gezeigt werden, dass die Protonierung nicht räumlich festgelegt, sondern vielmehr über das Peptidrückgrat verteilt ist. Diese Beobachtung ist Grundlage für die nachfolgend beschriebenen Mechanismen zur Fragmentierung einfach geladener Molekül-Ionen.

#### 2.4.7.1 Charge-site-induced Mechanismus

Für die Bildung von  $y^+$ -Fragment-Ionen ist eine intramolekulare Übertragung eines Wasserstoffatoms bzw. eines Protons nötig<sup>69</sup>. Für diese Übertragung wird ein cyclischer Übergangszustand vorgeschlagen (siehe Abbildung 16, 1a), bei dem ein nucleophiler Angriff der Imidgruppe auf die Carbonylgruppe der zu spaltenden Peptid-Bindung erfolgt<sup>69</sup>. Dabei wird das Wasserstoffatom am Stickstoff übertragen.

Alternativ wird die Übertragung des Wasserstoffatoms am  $\alpha$ -Kohlenstoff der Aminosäure N-terminal zur Bindungsbruchstelle<sup>70</sup> postuliert (siehe Abbildung 16, 1).

KENNY<sup>71</sup> (1992) untersuchte mit Deuterium-Austausch bzw. Deuterium-Labeling Experimenten den Fragmentierungsmechanismus erneut, und fand heraus, dass ein Imid-Wasserstoffatom und nicht das Wasserstoffatom am  $\alpha$ -Kohlenstoff während des Bindungsbruches wanderte (siehe Abbildung 16, 1a).

#### 2.4.7.2 Charge-site-initiated Mechanismus

Dieser Mechanismus geht von einer protonierten Peptidbindung aus (siehe Abbildung 16, 2). Die formal dem C-Terminus zugeordnete Ladung initiiert den Bindungsbruch. Das Wasserstoffatom bleibt am Stickstoff. Der Bindungsbruch führt zur Entstehung eines Neutralteilchens (y-Fragment) und des  $b^+$ -Fragmentes, welches nun die Ladung trägt und im Fragment-Ionenspektrum detektiert werden kann.

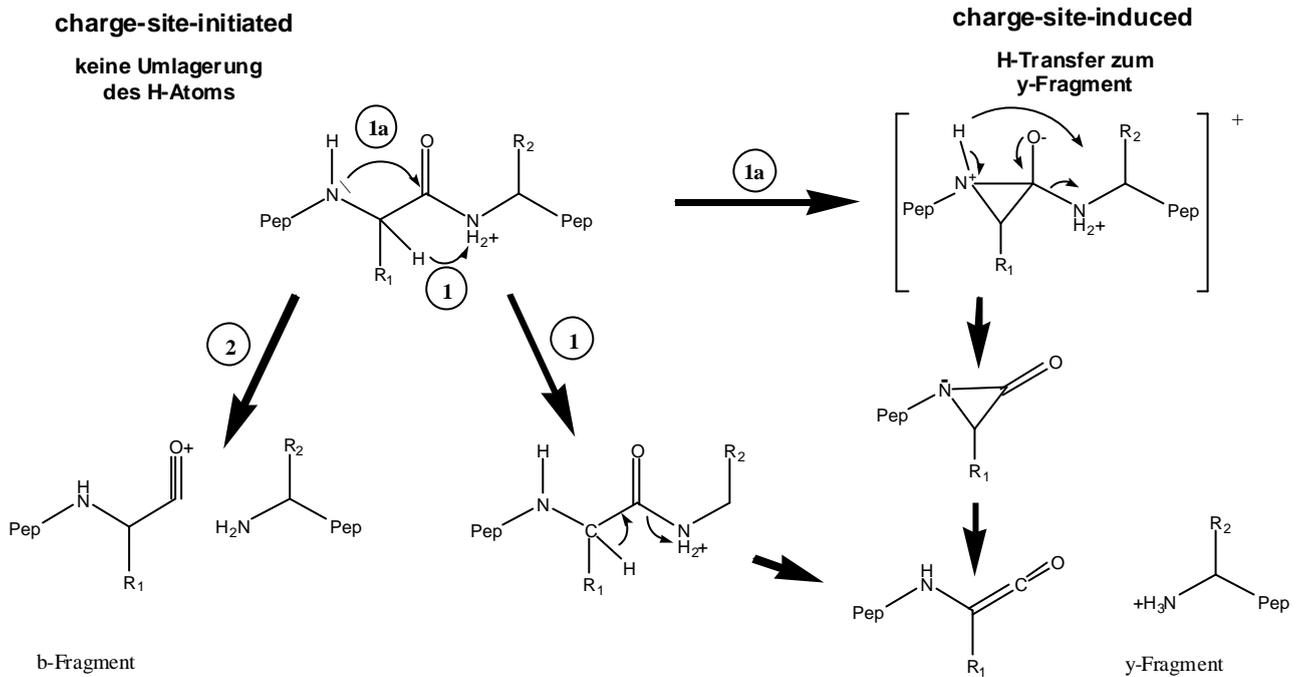


Abbildung 16: Fragmentierungsmechanismen unter Beteiligung des "mobilen" Protons.

## 2.4.8 Fragmentierungsmechanismen zweifach geladener Peptide

Für zweifach geladene Vorgänger-Ionen von tryptischen Peptiden lassen sich die Betrachtungen der Bindungsbruchmechanismen erweitern.

TANG<sup>72</sup> demonstrierte für zweifach geladene Peptid-Ionen eine feste Ladungslokalisierung am N-Terminus. Durch Acetylierung des N-Terminus wurde die Bildung von  $[M+2H]^{2+}$ -Ionen stark vermindert. Es entstanden nur noch einfach geladene Vorläufer-Ionen, was den Schluss nahe legte, das aufgrund der verminderten Protonenaffinität kaum eine zweite Protonierung erfolgte.

Für das acetylierte Peptid (GGYR) wurden keine Beweise gefunden, ob sich das zweite Proton nur angelagert hat, oder über die Amid-Stickstoffe des Peptidrückgrates verteilt vorliegt. Das Entstehen von zweifach geladenen  $y^{2+}$ -Fragmenten scheint dafür zu sprechen, dass eine Ladung am C-terminalen Arginin und die andere Ladung auf dem Peptidrückgrat verteilt ist.

Die für einfach geladene Peptid-Ionen beobachteten Fragmentierungsmechanismen lassen sich auch auf zweifach geladene Peptide übertragen. Dabei ist allerdings zu beachten, dass im obigen Beispiel eine Ladung auf der basischen Aminosäure des C-Terminus lokalisiert ist.

### 2.4.8.1 Charge-site-initiated Mechanismus bei zweifach protonierten Peptiden

Die formal dem N-Terminus zugeordnete Ladung initiiert den Bindungsbruch. Das C-terminale Peptid wird aufgrund der basischen C-terminalen Aminosäure, die eine feste Ladung trägt<sup>73</sup>, als einfach geladenes  $y^+$ -Fragment-Ion detektierbar. Da hier die beiden Ladungen auf das  $y$  und das

b-Fragment-Ion aufgeteilt werden, wird vielfach auch der Begriff der Ladungstrennung (*charge-separation* Mechanismus) verwendet.

### 2.4.8.2 Charge-site-induced Mechanismus bei zweifach protonierten Peptiden

Bei diesem Mechanismus wird intramolekular ein Wasserstoffatom umgelagert, wobei das Proton der Amidbindung den Bindungsbruch induziert. Das auf den Amid-Stickstoff umgelagerte Wasserstoffatom verbleibt auf dem C-terminalen Fragment. Durch die Ladungslokalisierung auf der Seitenkette der C-terminalen basischen Aminosäure entstehen wiederum  $y^{2+}$ -Fragmente.

### 2.4.8.3 Charge-site-remote Mechanismus bei zweifach protonierten Peptiden

Der Begriff *charge-remote* entstammt ursprünglich der Fragmentierung von Carbonsäuren, bei der die Bindungsbrüche im linearen Kohlenstoffgerüst in einiger Entfernung zur streng lokalisierten Ladung stattfindet. Der Mechanismus, der zu  $y^{2+}$ -Fragmenten führt, ähnelt dem zuvor beschriebenen Mechanismus zur Ausbildung einfach geladener  $y$ -Fragmente. Beide Protonen sind auf der C-terminalen Seite des Bindungsbruches zu finden. Die basische C-terminal Aminosäure trägt eine feste Ladung, die zweite Ladung ist nicht streng lokalisiert, sondern auf das Peptidrückgrat verteilt und sorgt für intensive Fragmentierung des Peptids.

Dieser Mechanismus wurde bei einfach geladenen Peptidderivaten beobachtet<sup>74</sup>, die über ein Phosphoniumsalz eine feste Ladung am N-Terminus besitzen. Da nur einfach geladene Molekül-Ionen im MALDI-PSD fragmentieren, müssen die Fragment-Ionen durch *charge-site-remote* Fragmentierung entstanden sein.

Bei mehrfach geladenen Vorläufer-Ionen sollten diese Mechanismen immer noch stattfinden, unabhängig davon, ob die feste Ladung durch ein Derivat oder durch eine feste Ladung einer basischen Aminosäure generiert wird.

## 2.4.9 Fragmentierungsverhalten mehrfach geladener Peptide

### 2.4.9.1 Einfluss des Protonierungsgrades

Die Protonierung der Peptidmoleküle sollte an den basischen Stellen (N-Terminus, Arg, Lys und [His]) bevorzugt stattfinden, da diese Residuen die höchste Basizität besitzen. Besitzt ein Peptid keine basischen Aminosäuren so besitzen die Amid-Protonen der Peptidkette (*peptide backbone*) die größte Basizität im Molekül. Der maximale Protonierungsgrad eines Peptids ist mit der Anzahl der basischen Zentren korreliert (N-Terminus, Arg, Lys und [His])<sup>75</sup>. Durch die Coulombabstoßung kann es aber auch zur gegenseitigen Beeinflussung bzw. einer Verschiebung der Ladungen auf dem Peptid kommen.

Für Peptide ohne basische Zentren wird das Maximum der möglichen Ladungszustände durch die Größe der Peptidkette bestimmt. Der limitierende Faktor ist hier vermutlich die Coulombabstoßung. Das Fehlen basischer Zentren sollte somit eine gleichmäßige Verteilung der Protonen über das Peptidrückgrat ermöglichen.

Unter Hochenergie-Stoßaktivierungsbedingungen wurden Proteine/Peptide mit einem Molekulargewicht von bis zu 5 kDa gemessen<sup>76</sup>. Die aus den verschiedenen Ladungszuständen erhaltene Sequenzinformation war dabei unabhängig vom Protonierungsgrad. Bei der Fragmentierung wurde eine Korrelation zwischen den basischen Zentren und dem Ladungszustand der Fragment-Ionen festgestellt. Die gebildeten Fragment-Ionen wiesen je nach Anzahl der noch enthaltenen basischen Aminosäuren einen entsprechenden Ladungszustand auf, was auf eine starke Ladungslokalisierung schließen läßt.

Unter Niederenergie-Stoßaktivierungsbedingungen zeigt sich jedoch ein verändertes Bild bei der Fragmentierung mehrfach geladener Precursor-Ionen<sup>77</sup>. Dem Vorläufer-Ion stehen durch den erhöhten Protonierungsgrad scheinbar weitere Protonen für Fragmentierungsreaktionen zur Verfügung. Tatsächlich aber wird die Sequenzinformation nicht alleine durch die Anzahl der Protonen verbessert, was den Autor zu dem Schluss veranlasst, dass die unter Niederenergie-Stoßaktivierung stark lokalisierten Protonen der basischen Zentren nur durch Hochenergie-Stoßaktivierungsbedingungen ausreichende Strukturinformationen zeigen. Der Grund hierfür liegt darin, dass die Protonen dann auf das Peptidrückgrat ausweichen und dort für intensive Fragmentierungen sorgen.

#### **2.4.9.2 Einfluss spezifischer Aminosäuren**

Aminosäuren mit funktionellen Gruppen (Asp, Glu, Lys, Arg, Cys) sowie mit strukturellen „Besonderheiten“ (Prolin) beeinflussen das Fragmentierungsverhalten des Peptids zusätzlich. Basische Aminosäuren, die ein Proton tragen, werden über die Coulombabstoßung ein mobiles Proton des Peptidrückgrates abstoßen. Dadurch kommt es möglicherweise zu Veränderungen im Fragmentierungsverhalten bzw. zur Veränderung von Fragmentierungsmechanismen innerhalb des Peptids. Negative Ladungen in den Seitenketten der Aminosäuren (z. B. Asp-Pro) zeigen bereits in Lösung<sup>78</sup> eine vermehrte Tendenz zum Bruch der Peptidbindung. Negative Ladungen führen zu einer Verringerung der Coulombabstoßung eines mobilen Protons und erhöhen damit die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Protons um die negative Ladung. Es kommt zu vermehrten Bindungsbrüchen in der Umgebung der negativen Ladung.

Für das dissozierende Proton in der Seitenkette des Aspartats konnte festgestellt werden, dass es C-terminal zum Aspartat einen Bindungsbruch in der Peptidkette induziert<sup>79</sup>.

## 2.5 Derivatisierung von Peptiden

Unter Derivatisierung (Modifikation) von Peptiden wird die kovalente Verknüpfung eines Moleküls oder Atoms mit dem Peptid verstanden. In der Natur finden solche Derivatisierungen nach der Translation (post-translational) statt. Chemische Derivatisierungen werden in der Peptidsynthese benötigt, um Schutzgruppen einzuführen oder das Peptid bei der MERRIFIELD Synthese an der festen Phase zu binden<sup>80</sup>.

## 2.6 natürliche post-translationale Protein-Modifikationen

Die Schwierigkeit bei der Sequenzaufklärung von Peptiden bzw. Proteinen liegt darin, dass sich die DNA codierte Aminosäuresequenz oft nicht im „reifen“ Protein wiederfindet sondern weitere Prozesse in eukaryotischen Organismen zu einer veränderten Struktur führen.

Zum einen werden bei der Reifung von Proteinen Signalsequenzen abgeschnitten oder interne Sequenzen ausgeschnitten (z. B.: C-Peptid aus Pro-Insulin). Bei der Expression rekombinanter Proteine in *Escherichia coli* wird die N-terminale Abspaltung von Methionin durch die Methionyl-Amino-peptidase beobachtet<sup>81</sup>.

Tabelle 4: kovalente post-translationale Proteinmodifikationen<sup>82</sup>.

Modifikation	Veränderung der monoisotopischen Masse	Veränderung der mittleren Masse
Gln⇒Pyroglutaminsäure	-17.0265	-17.0306
Bildung von Disulfidbrücken	-2.0157	-2.0159
Formylierung	27.9949	28.0104
Acetylierung	42.0106	42.0373
Carboxylierung	43.9898	44.0098
Phosphorylierung	79.9663	79.9799
Sulfatierung	79.9568	80.0642
Trifluoracetylierung	95.9823	96.0087
Glykosylierung, Pentose	132.0423	132.1161
Glykosylierung, Desoxyhexose	146.0579	146.1430
Glykosylierung, Hexosamin	161.0688	161.1577
Glykosylierung, Hexose	162.0528	162.1424
Glykosylierung, N-Acetylhexosamin	203.0794	203.1950
Addition von Liponsäure	188.0330	188.3147
Farnesylierung	204.1878	204.3556
Myristoylierung	210.1984	210.3598
Biotinylierung	226.0776	226.0776
Pyridoxalphosphat	231.0297	231.1449
Addition von Glutathion	305.0682	305.3117
Adenosylierung	329.0525	329.2091

Zum anderen werden einzelne Aminosäuren kovalent mit nicht peptidartigen Gruppierungen modifiziert (siehe Tabelle 4). Schätzungsweise 50% der Proteine werden im Golgi-Apparat oder im endoplasmatischen Reticulum post-translational modifiziert.

Zu bemerken ist, dass es nicht nur Modifikationen gibt, die das Molekulargewicht der Peptide erhöhen, sondern auch solche, die es verringern. Von Bedeutung ist insbesondere die Ausbildung von Disulfidbrücken (siehe Tabelle 4, Zeile 1), da sie einen Hinweis auf die Faltung des Proteins geben. Die Bildung von Pyroglutaminsäure (ebenso wie Pyroglutarsäure) verhindert die Edmann-Sequenzierung und andere Derivatisierungsreaktionen am N-Terminus.

Bei der Sequenzanalyse sind modifizierte Aminosäuren schwer zu identifizieren, da sie zumeist eine erhöhte Residuenmasse besitzen. Die Interpretation wird dadurch erschwert, dass die Seitenketten zum Teil eigenen Fragmentierungen unterliegen (z. B. bei Glykosylierungen). Die häufigsten natürlich vorkommenden Modifikationen und ihre Besonderheiten sollen im Folgenden beschrieben werden.

### 2.6.1 Glykosylierung

Die kovalente Modifizierung von Proteinen durch Kohlenhydrate erfolgt über einen Stickstoff (N-Glykosylierung) oder seltener über einen Sauerstoff (O-Glykosylierung). Dabei erreicht der Anteil der Kohlenhydrate am Molekulargewicht des Proteins bis zu 50% (w/w). Für die O-Glykosylierung an Ser/Thr ist keine Konsensussequenz (Erkennungssequenz) bekannt. Die N-Glykosylierung an Asparagin dagegen besitzt als Konsensussequenz die Aminosäurefolge Asn-Xxx<sup>III</sup>-Thr/Ser. Die N-Glykosylierung besteht grundsätzlich aus zwei linearen  $\beta$ -Glucosemolekülen und einem  $\beta$ -Mannose-Molekül, das mit zwei weiteren  $\alpha$ -Mannose-Molekülen verknüpft ist. Diese Einheit wird auch als Kern (*core*) bezeichnet. Von dieser Kernstruktur leiten sich durch unterschiedliche Glykosylierungsmuster in den Zweigen drei Grundstrukturen ab: der Hoch-Mannose-Typ, der Hybrid-Typ und der komplexe Typ. Innerhalb der Gruppen gibt es noch eine große Diversität an den äußeren Kohlenhydrat-Einheiten, was für ihre Funktion bei der hochspezifischen Zell-Zell Erkennung essentiell ist. Zusätzlich wird durch den hohen Kohlenhydrat-Anteil die Löslichkeit der Proteine verbessert.

Für die Massenspektrometrische Analyse des Molekulargewichts eines Proteins wird der Kohlenhydrat-Anteil mit einer spezifischen Glykosidase entfernt, um die Strukturaufklärung zu erleichtern.

---

<sup>III</sup> Xxx ist eine beliebige Aminosäure außer Prolin oder Asparagin.

## 2.6.2 Phosphorylierung

Proteine werden durch Phosphorylierungen (Übertragung einer Phosphatgruppe) an Serin-, Threonin- oder Tyrosinseitenketten kovalent modifiziert. Der reversible Phosphateinbau wird durch Kinasen (Phosphateinbau) und durch Phosphorylasen (Dephosphorylierung) katalysiert. Die reversible Phosphorylierung ist eine typische Reaktion bei rezeptorvermittelten Signalkaskaden, wobei über Protein/Protein Interaktion an der Zelloberfläche ein Signal durch die Zellwand hindurch vermittelt wird. Die membrandurchspannenden Rezeptoren geben das Signal über einen Phosphateinbau an weitere Proteine oder über eine Autophosphorylierung (auf dem intrazellulären Rezeptor) in das Innere der Zelle weiter.

Auch bei der Regulierung der Stoffwechselaktivität ist die reversible Phosphorylierung ein gängiger Mechanismus. Proteine können dabei in unterschiedlichen Phosphorylierungsgraden vorliegen, durch die sich die Enzymaktivität regulieren lässt. Dabei bedeutet eine Phosphorylierung nicht immer gleich Aktivität des Enzyms.

Für die biochemische Detektion der Phosphorylierung von Proteinen wird routinemäßig mit radioaktivem Phosphat gearbeitet. Aufgrund des Gefährdungspotentials durch radioaktiven Phosphor bietet die Massenspektrometrie eine Alternative bei der Analyse von Phosphopeptiden. Durch die charakteristischen Fragmentierungen der phosphorylierten Aminosäuren lassen sich Proteine, die Phosphat enthalten, detektieren (*Neutral loss scan*). Durch MS/MS-Experimente kann die Position der Aminosäure im Protein bestimmt werden.

Phosphoserin zeigt unter MS/MS-Bedingungen eine starke Tendenz zur Eliminierung von Phosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\Delta$  98 Da)<sup>83</sup>, wodurch sie in einem *constant neutral-loss scan* mit einem *triple-Quad*-Gerät selektiv fragmentiert werden können<sup>84</sup>. Aus Phosphotyrosinresten wird die Abspaltung von phosphoriger Säure ( $\text{H}_2\text{PO}_3$ ,  $\Delta$  81 Da) und Phosphinsäure ( $\text{HPO}_3$ ,  $\Delta$  80 Da) beobachtet<sup>85</sup>. Eine Abspaltung von  $\text{H}_3\text{PO}_4$  aus Phosphotyrosin wird beobachtet, wenn ein Asparat im Peptid vorhanden ist<sup>86</sup>.

Mit der Ionenfalle können diese Peptide ebenfalls leicht detektiert werden, da sie unter MS/MS Bedingungen die charakteristischen Neutralverluste von 80 Da, 81 Da bzw. 98 Da zeigen. Es besteht allerdings Verwechslungsgefahr mit sulfatierten Peptiden die teilweise gleiche Neutralverluste zeigen (siehe 2.6.3). Phosphatreste tragen eine negative Ladung unter ESI-Bedingungen.

## 2.6.3 Sulfatierung

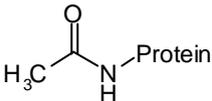
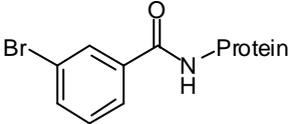
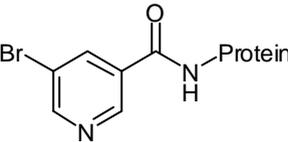
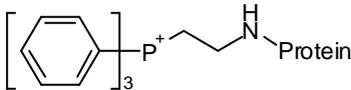
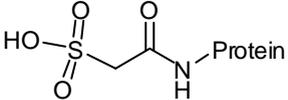
Tyrosinreste in Proteinen werden im trans-Golgi Komplex von einer Sulfotransferase sulfatiert<sup>87</sup>. Die unter aciden Bedingungen labile Sulfat-Tyrosin Bindung<sup>88</sup> sorgt unter ESI-MS Bedingungen dafür, dass sich S-Peptide durch einem charakteristischen Neutralverlust von Schwefeltrioxid ( $\text{SO}_3$ , 80 Da) und ( $\text{SO}_4$ , 96 Da) identifizieren lassen<sup>89</sup>. Der Schwefeltrioxid-Verlust lässt sich durch

die Verwendung eines leicht basischen pH-Wertes im Lösungsmittel im Negativ-ESI-Modus minimieren, so dass  $\text{SO}_3$  bevorzugt in den Fragment-Ionen verbleibt..

## 2.7 Derivatisierungen zur Manipulation von Fragment-Ionenspektren

In der Massenspektrometrischen Peptidanalytik werden chemische Derivatisierungen unter anderem dazu benutzt, die Ionisierbarkeit der Analytmoleküle zu erhöhen<sup>90</sup>, die Oberflächenaktivität (bei FAB-MS) durch Einführung unpolarer Funktionalitäten zu verbessern<sup>91</sup> oder einzelne Aminosäuren mit identischer Residuenmasse zu unterscheiden (z. B.: Lys/Gln).

*Tabelle 5: Übersicht der Derivatisierungen zur Ladungsmanipulation.  $D$   $m$  gibt die Masse an, um die sich die Proteinmasse bei einfacher Derivatisierung erhöht. Bei Brombenzoylierung und Bromnikotinylierung wird automatisch eine Labelung des Proteins durch die stabilen Isotopen des Broms erzielt. Die möglichen Isotopenlabel lassen sich durch Verwendung von 50% Deuterium ( $D$ ) an allen nicht aciden Protonen realisieren.*

	Strukturformel	$D$ $m$ [Da]	Ladungsmanipulation	Isotopenlabel [Da]
Acetylierung		42	Erniedrigung der Basizität	$\Delta$ 3 (D)
Brombenzoylierung		185	Erniedrigung der Basizität	$\Delta$ 2 (Br) $\Delta$ 8 (Br und D)
Bromnikotinylierung		186	Erniedrigung der Basizität, Einführung einer vorgeformten positiven Ladung	$\Delta$ 2 (Br) $\Delta$ 5 (Br und D)
Alkylierung mit Bromethyltriphenylphosphin		289	Einführung einer fixierten positiven Ladung	$\Delta$ 15 (D Phenyl)
Acylierung mit Chloro-Sulfonylacetyl Chlorid		122	Erniedrigung der Basizität, Einführung einer sauren Gruppe	$\Delta$ 2 (D)

Chemische Derivatisierungen können auch zur gezielten Manipulation der Fragmentierungen eines Proteins genutzt werden. Da die basischen Zentren (Arg/His/Lys/N-Terminus) ein Ort bevorzugter Ladungslokalisierung in einem Protein darstellen und somit in den Fragmentierungsprozess direkt oder indirekt involviert sind, liegt es nahe durch chemische Modifikation dieser basischen Zentren das Fragmentierungsverhalten der Peptide zu beeinflussen. Über die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der neu eingefügten funktionellen Gruppen soll die Fragmentierung im Peptid gesteuert werden<sup>92</sup>.

Die in dieser Arbeit untersuchten Derivatisierungsreaktionen lassen sich bezüglich ihres Einflusses auf das Fragment-Ionenspektrum in drei Kategorien unterteilen.

- Acetylierung zur Verringerung der Basizität der basischen Zentren (N-Terminus und Lys)
- Einführung einer zusätzlichen positiven Ladung
- Einführung einer negativen Ladung

Alle diese Derivatisierungsreaktionen können zusätzlich mit stabilen Isotopen modifiziert werden (siehe Tabelle 5 und 2.7.4), so dass die Fragment-Ionen, die ein Derivat enthalten, über die Isotopenverteilung von den übrigen Fragment-Ionen unterschieden werden können.

Um das Fragmentierungsverhalten von Proteinderivaten effektiv untersuchen zu können, müssen die Derivatisierungsreaktionen folgende Kriterien erfüllen:

- quantitative Reaktion
- keine oder nur wenige Nebenprodukte gleicher Molekülmasse
- einfache, schnelle Reaktionsführung mit geringem Aufwand für die Probenreinigung
- kontrollierte (vorhersehbare) Fragmentierung des Proteinderivates

Im Folgenden werden die Reaktionen beschrieben.

### 2.7.1 Acylierung der basischen Zentren

Die primären Aminogruppen des Lysins und des N-Terminus sind aufgrund ihrer Reaktivität besonders geeignet für die Derivatisierung<sup>93</sup>. Die basischen Zentren (Arg/His/Lys/N-Terminus) sollen derart modifiziert werden, dass die Protonenaffinität herabgesetzt wird. Die durch Acylierung gebildete Amid-Gruppe besitzt in etwa die gleiche Basizität wie die Amid-Gruppen der Peptidbindungen im Protein. Dadurch soll eine vermehrte und gleichmäßigere Protonierung des Peptidrückgrats erreicht werden, um so eine Fragmentierung durch einen *charge-site-induced* oder einen *charge-site-initiated* Mechanismus zu ermöglichen. Nur durch zusätzliche Fragmentierung in der Peptidkette können so neue Sequenzinformationen erhalten werden.

Die Acetylierung kommt auch als post-translationale Modifikation (siehe Tabelle 4) in der Natur vor. In der Proteinanalytik wird die Acetylierung mit Essigsäureanhydrid zur Bestimmung der an der Proteinoberfläche exponierten basischen Aminosäuren verwendet<sup>94</sup>. Nach Derivatisierung des underivatisierten Proteins werden in einem vergleichenden *peptide-mapping* (derivatisiert/underivatisiert) die Peptide bestimmt, die ein erhöhtes Molekulargewicht besitzen. Pro Acetylierung wird die Masse um 42 Da erhöht. Die Modifizierung mit Bernsteinsäureanhydrid (Succinylierung) ist ebenso eine Acylierung, mit dem Unterschied, dass die Masse des Proteinderivats um 100 Da pro Succinylierung erhöht wird.

Durch den Einsatz von zu 50% deuteriertem Essigsäureanhydrid kann durch die Acetylierung eine gleichzeitige Isotopenlabelung ( $\Delta m = 3$  Da) der Fragment-Ionen erreicht werden<sup>95</sup>.

Andere Säuren lassen sich an die basischen Zentren koppeln, indem zunächst über N-Hydroxysuccinimid aktivierte Ester gebildet werden, die anschließend mit dem Protein umgesetzt werden. So lässt sich Brom-Nikotinsäure<sup>96</sup> an den N-Terminus und an das Lysin koppeln (siehe Tabelle 5). Die Brom-Nikotinsäure erhöht durch das Stickstoffatom des Pyridinringes die Ladungsdichte, bzw. zieht die feste Ladung vom derivatisierten N-Terminus ab. Zusätzlich lassen sich b-Fragment-Ionen über die stabilen Isotopen des Broms (siehe 2.7.4) identifizieren. Bei Verwendung von Brombenzoesäure wird keine Ladung im Derivat durch ein basisches Zentrum lokalisiert.

Arginine lassen sich mit Acetylaceton derivatisierten<sup>97</sup>, um die Basizität in den Seitenketten des Arginins zu verringern. Unter MALDI-Bedingungen wurden die sequenzspezifischen Fragmentierungen um einen Faktor 2-3.5 verbessert.

Über Gasphasenreaktionen wird mit Aceton eine Adduktbildung am N-Terminus erreicht, welche die Fragmentierung von Peptiden zum Ladungsverbleib am N-Terminus dirigiert<sup>98</sup>. Aceton wird bei diesem Verfahren direkt in das Massenspektrometer injiziert.

### 2.7.2 Einführung einer positiven Ladung

Durch die Derivatisierung mit Phosphoniumsalzen soll die Anzahl der fixierten positiven Ladungen auf dem Peptid erhöht werden<sup>99</sup>. Durch gezielte N-terminale Addition von Brom-Ethyltriphenylphosphin (Br-TPP)<sup>100</sup> wird erreicht, dass die zusätzliche Ladung das mobile Proton vom N-Terminus auf das Peptidrückgrat verschiebt. Die Experimente wurden unter FAB-MS Bedingungen durchgeführt, bei denen zusätzlich die erhöhte Oberflächenaktivität des Derivates die Ionenbildung verbessern sollte. Durch das Phosphoniumsalz ist die Ladung am Phosphor fixiert, so dass die zusätzlichen Fragmentierungen im Bereich des N-Terminus nach einem *charge-remote* Mechanismus ablaufen<sup>74</sup>.

### 2.7.3 Einführung einer negativen Ladung

Es wurde beobachtet, dass ein peroxidiertes Cysteinrest (Cysteinsulfonsäure) als N-terminale Aminosäure in einem tryptischen Peptidfragment ausschließlich zur Bildung von  $\gamma$ -Fragment-Ionen<sup>101</sup> führte. Dabei sollte die intraionische Interaktion der negativ geladenen Cysteinsulfonsäure mit dem protonierten C-terminalen Arginin zu einer verbesserten Ladungsverteilung führen. Von COX<sup>102</sup> et. al. konnte durch die Einführung von sauren Gruppierungen (Cysteinsulfonsäure) auf der Peptidkette die Ladungslokalisierung auf den Argininresiduen ausgeglichen werden. Die Beobachtungen bei der Oxidation des Cysteins wurden von KEOUGH et al.<sup>103</sup> umgesetzt, indem sie den N-Terminus mit einer negativen Ladung modifizierten. Mit einem Säurechlorid (Chloro-Sulfonylacetylchlorid, CSAC) wird der N-Terminus acyliert, wobei es zu Nebenreaktionen mit der

$\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins kommt<sup>104</sup>. Für die Identifizierung von Proteinen durch tryptischen Verdau mit anschließender CSAC-Derivatisierung sind Peptide, die C-terminal ein Arginin enthalten, daher besser geeignet.

Nach der Derivatisierung mit CSAC wurde für die Fragment-Ionenspektren eines einfach geladenen Peptid-Derivats (sulfonyliert ADSGEGDFLA<sup>10</sup>EGGGVR) eine bevorzugte Bildung von  $\gamma$ -Fragment-Ionen beobachtet<sup>105</sup>. Aus dem zweifachen Ladungszustand des gleichen underivatisierten Peptids wurde ein vergleichbares Spektrum erhalten. Dieses Peptid enthielt lediglich ein Arginin am C-Terminus, so dass vermutlich dort eine Ladung lokalisiert war und eine zweite Ladung auf dem Peptidrückgrat verteilt war. Durch die Derivatisierung mit CSAC wird neben der Erniedrigung der Basizität eine zusätzliche fixierte negative Ladung eingeführt. Dadurch wird das mobile Proton angezogen, so dass verstärkt Fragmentierungen stattfinden können, die Sequenz-Informationen über den N-Terminus enthalten.

Negative Ladungen werden auch zur C-terminalen Derivatisierung eingesetzt<sup>106</sup>. Dabei soll durch 4-Amino-Naphtalin-Sulfonsäure (ANSA) für Peptide eine verbesserte Fragmentierung im negativen MS-Modus erreicht werden. Die Fragment-Ionenspektren zeichnen sich durch die bevorzugte Bildung von  $\gamma$ -Fragment-Ionen aus, bei denen die negative Ladung am C-Terminus lokalisiert ist. Auch diese Reaktion ist nicht selektiv für den C-Terminus, sondern es werden Nebenreaktionen mit den sauren Seitenketten von Glutamat und Aspartat vermutet. Dadurch wäre eine negative Ladung auch auf der Mitte des Peptids lokalisiert, was den Effekt der ausschließlichen  $\gamma$ -Fragment-Ionenbildung ausgleicht. Deshalb wird die Derivatisierung mit ANSA in Kombination mit Peptiden aus einem Verdau mit Glu/Asp spezifischen Proteasen durchgeführt, wodurch die beiden am C-terminalen Ende fixierten negativen Ladungen die Fragmentierung beeinflussen.

## 2.7.4 Isotopenlabelung

Mit Hilfe selektiver Derivatisierungsreagenzien, die Atome mit einer charakteristischen Isotopenverteilung enthalten (z. B.:  $^{79}\text{Br}:$  $^{81}\text{Br}$  Verhältnis 1:1) können beispielsweise die b-Fragmente „markiert“ (gelabelt) werden<sup>107 96</sup>.

Bei der zweifachen Derivatisierung mit Brom-Atomen wird das Brom-Isotopenmuster aus zwei Atomen zusammengesetzt. Es ergibt sich ein neues charakteristisches Muster ( $^{79}\text{Br}^{79}\text{Br}:$  $^{79}\text{Br}^{81}\text{Br}:$  $^{81}\text{Br}^{81}\text{Br}$  Verhältnis 1:3:1). Durch die Überlagerung mit  $^{13}\text{C}$ -Isotopen (siehe Abbildung 17) verschwindet die Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen „gelabelten“ und „ungelabelten“ Ionen. Besonders mit zunehmender Masse der Ionen wird der Einfluss der  $^{13}\text{C}$ -Isotopen größer, so dass die Isotopen des/der Bromatom(e) nicht mehr signifikant sind.

Unter FAB-Bedingungen konnten b-Fragment-Ionen detektiert werden, wobei Nebenreaktionen nicht berücksichtigt worden sind. Ähnliche Ansätze werden durch Einsatz von deuteriertem Wasser

(50% D<sub>2</sub>O und 50% H<sub>2</sub>O) beim tryptischem Verdau von Proteinen angewendet<sup>108</sup>. Dort sind die y-Fragmente mit einem Label von 2 Da versehen.

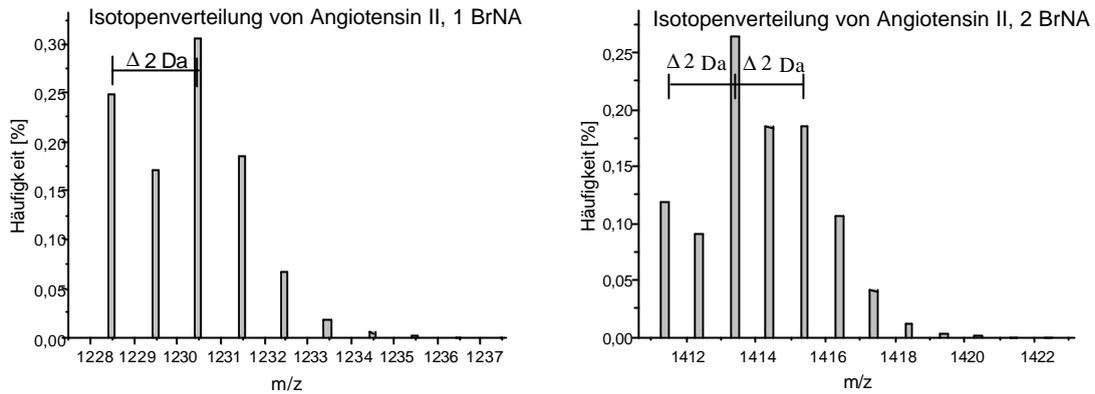


Abbildung 17: Theoretische Isotopenverteilung von mit BrNA derivatisiertem Angiotensin II (8 AS); Isotopenverteilung bei einfacher (links) und zweifacher (rechts) Derivatisierung; Das charakteristische Brom-Isotopenmuster wird durch die Kohlenstoff<sup>13</sup>C-Isotopen überlagert.

Durch Acetylierung mit zur Hälfte deuteriertem Essigsäureanhydrid lässt sich ein Label von 3 Da erzeugen (siehe Tabelle 5).

In den Anfängen der Proteinchemie wurde 2,4-Dinitrofluorbenzol (DNFB, „Sangers Reagenz“) zur Labelung des N-Terminus benutzt<sup>109</sup>. Für die Peptidanalytik wird ein zu 50% deuteriertes Reagenz ( $\Delta m = 3 \text{ Da}$ ) als Isotopenlabel verwendet<sup>110</sup>. Durch die selektive Reaktion mit dem N-Terminus von Peptiden ist es zur Labelung der b-Fragment-Ionen geeignet. Zusätzlich wurde eine verbesserte Intensität der b-Ionenfragmente gegenüber dem underivatisierten Peptid gefunden.

### 3 Zielsetzung der Dissertation

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten chemische Derivatisierungen an den basischen Zentren (Lys, N-Terminus) von Peptiden untersucht werden, mit dem Ziel „de novo“ Sequenzierungen von Proteinen zu erleichtern. Für sämtliche Derivatisierungsstrategien müssen folgende Punkte bearbeitet und diskutiert werden:

- Zunächst müssen geeignete Reaktionsbedingungen gefunden werden, um selektiv und vollständig derivatisieren zu können. Mögliche Nebenreaktionen müssen untersucht werden, damit es bei unbekanntem Peptiden nicht zu Fehlinterpretationen kommt.
- Bei der MS/MS-Analyse der Peptidderivate wird der Einfluss der unterschiedlichen Derivatisierungen auf das Fragmentierungsverhalten untersucht. Basische Zentren eignen sich wegen ihrer hohen Reaktivität für die Derivatisierung und sind aufgrund ihrer Basizität als Orte bevorzugter Protonierung ebenfalls maßgeblich am Fragmentierungsverhalten von Peptiden beteiligt.
- Bei der Frage nach neuen Fragmentierungen oder Verbesserungen der Intensität von Fragment-Ionen muss ebenso der Einfluss des Protonierungsgrades (Ladungszustandes) von Vorläufer-Ionen auf das Fragmentierungsverhalten untersucht werden.
- Weitere Fragestellungen ergeben sich aus spezifischen Aminosäuren (Asp, Pro, Ser, His, Arg), deren Einfluss auf das Fragmentierungsverhalten gravierend sein kann. Wenn dieser Einfluss verstanden ist, können Rückschlüsse aus dem Fragmentierungsverhalten die Interpretation von Spektren erleichtern.
- Als weiteres Werkzeug für die Interpretation von Fragment-Ionenspektren kann die selektive Markierung von Fragment-Ionen mit stabilen Isotopen genutzt werden. Von geeigneten Derivatisierungsreagenzien sollen künstliche „Isotopen-Label“ auf ihre Anwendbarkeit untersucht werden.

Es werden zunächst Derivatisierungen von kleinen Peptiden (7-10 Aminosäuren) durchgeführt, um die Fragen der Reaktivität und der Selektivität zu klären. Erste Erkenntnisse über den Einfluss auf das Fragmentierungsverhalten werden dann auf größere Peptide (20-30 Aminosäuren) übertragen, mit dem Ziel den Einfluss der Derivate und des Ladungszustandes auf das Fragmentierungsverhalten mehrfach geladener Vorläufer-Ionen zu verstehen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Materialien und Geräte

#### 4.1.1 Verwendete Proteine

*Rhodopsin-Outer-Segments*-Peptide (Institut für medizinische Physik/Biophysik, Humboldt Universität, Berlin)

Angiotensin I, Angiotensin II, Rinder-Insulin, Bradykinin und Glucagon (Sigma)

#### 4.1.2 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Abkürzung	Gefahrenpotential	Bezugsquelle	Bemerkungen
4-Brom-Nikotinsäure	BrNA		Sigma	
4-Vinylpyridin	VP	T	Fluka	p.a.
Acetonitril	ACN	F, T	Roth	
$\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy Zimtsäure	CCA	X	Sigma	
Ameisensäure	HCOOH	C		
Ammoniumacetat		X	Sigma	p.a.
Ammoniumhydrogencarbonat		X	Fluka	
Bernsteinsäureanhydrid		X	Fluka	
Chlor-Sulfonylacetylchlorid	CSAC	C	Aldrich	
Dibromethan				frisch destilliert
Diethylether		F		frisch destilliert
Dithiothreitol	DTT		Aldrich	
Essigsäure		C	Merck	p.a.
Essigsäureanhydrid	ESA	C	Merck	p.a.
Ethanol	EtOH	F	Merck	p.a.
Ethyl-diisopropylamin	TEA	F, X	Merck	
Harnstoff		X	Sigma	
Iodacetamid	IAA	T	Sigma	
Iodessigsäure	IE	C	Sigma	p.a.
m-Bromo-Benzoessäure	BrBA	X	Fluka	p.a.
Methanol	MeOH	F, T	Merck	p.a.
N,N-Dimethylformamid	DMF	T	Fluka	p.a.
N-Ethylmorpholin		C	Fluka	
N-Hydroxy-2,5-pyrrolidin-dion	NHS		Sigma	p.a.
Sinapinsäure	SA		Fluka	
Trifluoressigsäure	TFA	C	Fluka	
Triphenylphosphin	TPP	X	Aldrich	
Tris-(hydroxymethyl) aminomethan	TRIS	X	Merck	

Das verwendete Wasser wird mit einer Reinstwasseranlage (Seralpur Delta, USF Seral, Ransbach) entsalzt. Angesetzte Pufferlösungen werden nach Einstellen des pH-Wertes filtriert (Celluloseacetatfilter 0.2 µm, Sartorius, Göttingen).

### 4.1.3 Verwendete Laborgeräte

#### Massenspektrometrische Instrumente

LCQ (T)	Finnigan MAT (Bremen)
Biflex III (re-TOF)	Bruker Daltonics (Bremen)

#### HPLC-System für LC-MS Kopplung

Binäre Pumpe mit Dioden-Arraydetektor und Online Entgaser Serie HP1100	Hewlett Packard (Waldbronn)
Autosampler HP 1100	Hewlett Packard (Waldbronn)
Säulenofen HP1100	Hewlett Packard (Waldbronn)
Säule: Nucleosil S C-18, 100 Å	Phenomenex (D)

#### FPLC-System zur präparativen Proteintrennung

ÄKTA Explorer	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Säule: Resource™ RPC, 3 ml	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)

#### Lyophilisator (SpeedVac)

Lyovac GT 2	Leybold (Hanau)
Univapo 150 H mit	Savant Instruments (Holbrook NY, USA)
Unicryo MC 1C	

#### Sonstige Geräte

Analysenwaage FA-210-4	Faust (Köln)
Laborwaage SBA 52	Scaltec (Heiligenstadt)
Tischzentrifuge Centrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg)
pH-Meter 766 Calimatic	Knick (Berlin)
pH-Elektrode Typ Nr. 6280	Schott-Geräte (Hofheim)
Heizblock Unitek HB-130	SEL-Laboratory Products (England)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Bond Elut-C18 (Festphasen-Extraktion)	CS (Langerwehe)
Membranfilter 0.025 µm	Millipore (Eschborn)

#### Verbrauchsmaterialien

Eppendorf-Reaktionsgefäße (0.5, 1 und 1.5 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen	
Bördelgläschen	OmniChrom (Schermbbeck)

#### 4.1.4 Verwendete Computersoftware

<b>GPMAW</b>	GPMAW (Version 4.02) bietet über die umfassende Bearbeitung von Proteinsequenzen unter Einbeziehung von massen-spektroskopischen Daten hinaus die Möglichkeit, einzelne Fragment-Ionenserien für Peptide zu berechnen. Demoverionen und Handbuch zu GPMAW sind unter <a href="http://www.welcome.to/gpmaw">www.welcome.to/gpmaw</a> erhältlich.
<b>PAWS</b>	PAWS (Version 8.5.1) bietet eine Umgebung zur Analyse von Proteinen basierend auf massenspektrometrischen Daten. Es ist unter <a href="http://www.prowl.rockefeller.edu">www.prowl.rockefeller.edu</a> frei erhältlich. Unter gleicher Adresse gibt es noch einen Word-Schriftsatz für Aminosäuren, sowie weitere nützliche Informationen über Massenspektrometrie ( <i>peptide-map-analysis tools, protocols, matrices for MALDI</i> ).
<b>XMASS 5.0</b>	Auswertungssoftware für MALDI Spektren für Biflex III.
<b>Navigator</b>	Programmpaket für die Datenaquisition bei LC-MS, LCQ.
<b>MS-Office</b>	Schreibprogramme, Bearbeiten der Spektren.
<b>Microcal Origin 6.0</b>	Einbinden der MALDI-Spektren in Word.

Die Literaturrecherche erfolgte mit Hilfe von Literaturdatenbanken, die im Internet unter folgenden Adressen frei zugänglich sind:

[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)

Die Proceedings of the *Annual Conference of the American Society of Mass Spectrometry* finden sich unter der Internet-Adresse [www.asms.org](http://www.asms.org).

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Präparation der A- und B-Kette des Rinder-Insulins

#### 4.2.1.1 Reduktive Spaltung und Alkylierung der Cysteine<sup>111</sup>

Zur Gewinnung der beiden Ketten des Rinder-Insulins müssen die Disulfidbrücken gespalten und die Cysteine alkyliert werden, um eine Rückbildung von Disulfidbrücken zu verhindern. Insulin wird in 0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 8 M Harnstoff mit einer Konzentration von 400  $\mu\text{M}$  gelöst (15 min). Die DDT-Lösung wird in 50fachem molaren Überschuss (bezogen auf die Anzahl der Cysteine) zugegeben und 30 min bei 57°C inkubiert. Nach Abkühlen der Lösung auf RT wird Iodacetamid (IAA) in einem 250fachen molaren Überschuss (bezogen auf Cystein) zugegeben.

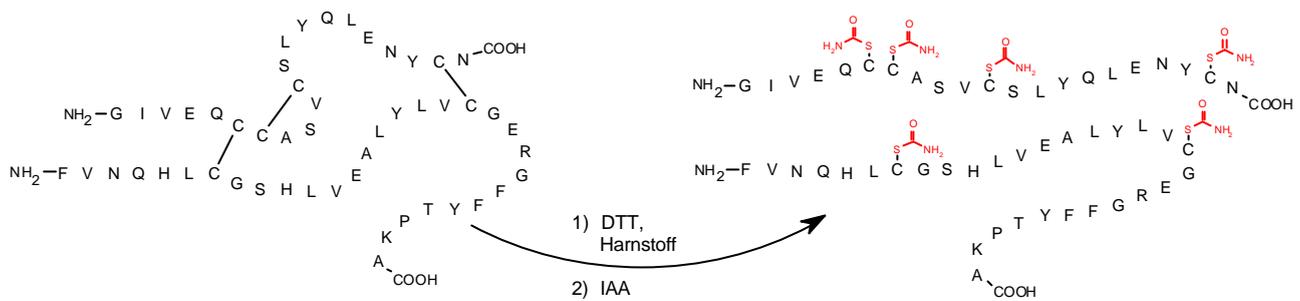


Abbildung 18: Reaktionsschema der reduktiven Alkylierung des Rinder-Insulins.

Nach 20 minütiger Inkubation bei RT im Dunkeln wird die Reaktion mit 1  $\mu$ l Essigsäure abgestoppt. Die Reaktionslösung wird direkt über eine *reversed-phase* Säule chromatographiert.

DTT-Lösung: 60 mM in 0.1 M  $\text{NH}_4\text{CO}_3$ , 8M Harnstoff

IAA-Lösung: 300 mM in 0.1 M  $\text{NH}_4\text{CO}_3$

Alternativ wird nach dem gleichen Protokoll mit Iodessigsäure alkyliert. Für die Alkylierung mit Vinylpyridin<sup>112</sup> wurde eine Abspaltung von Vinylpyridin bei MS/MS-Experimenten beobachtet (nicht gezeigt).

#### 4.2.1.2 Präparative Chromatographie der Insulinketten über FPLC

Verwendet wird eine *reversed-phase* Säule Resource<sup>TM</sup> RPC (Pharmacia Biotech) mit einem Säulenvolumen von 3 ml. Als Chromatographie-Anlage wird der ÄKTA-Explorer (Pharmacia Biotech) verwendet.

- Laufmittel A: 2% Acetonitril, 0.065% TFA
- Laufmittel B: 100% ACN, 0.05% TFA
- Gradient: 0% B  $\rightarrow$  50% B über 20 Säulenvolumina
- Flussrate: 2  $\frac{\text{ml}}{\text{min}}$

Die Eluatfraktionen werden gesammelt und massenspektrometrisch auf Verunreinigungen geprüft. Anschließend werden die Proben lyophilisiert und bei  $-18^\circ\text{C}$  gelagert, um sie als Ausgangssubstanzen für weitere Derivatisierungen einzusetzen.

#### 4.2.1.3 Analytische HPLC-MS/MS

Um den Einfluss der Alkylierung mit Iodessigsäure auf die Fragmentierung zu untersuchen, werden zwei Aliquots des Reaktionsgemisches (IAA-Derivate bzw. Iodessigsäure-Derivate) über eine analytische HPLC (HP Serie 1100) getrennt und mittels Tandem-Massenspektrometrie (LCQ) analysiert. Als Trennmedium wird eine *reversed-phase* Säule Nucleosil S  $\text{C}_{18}$  100 (Phenomenex) verwendet.

- Laufmittel A: 5% Acetonitril, 0.065% TFA
- Laufmittel B: 100% ACN, 0.05% TFA
- Gradient:

Zeit [min]	LM B [%]
0.0	2
10.0	2
10.1	30
80.0	60
80.1	90
86.0	90
86.1	0
94.0	0

Flussrate: 0.5  $\text{m}^3/\text{min}$  Split 1/10

Probenvolumen: 40  $\mu\text{l}$

Temperatur: 25 °C

Bedingungen der ESI-Quelle:

Source Voltage [kV]	4.25
Sheath Gas Flow Rate [ $\text{l}^{\text{IV}}$ ]	80
Capillary Voltage [V]	43
Tube Lens Offset [V]	45

Die MS/MS Bedingungen werden in einem *dependent-mass scan* von einer Liste der erwarteten Ionen ausgewählt (m/z: 1172, 1173, 1284, 1286). Sobald diese Ionen einer bestimmten Ionenmenge detektiert werden, wird mit diesen Ionen ein MS/MS-Experiment durchgeführt. Dazu wird die Isolationsbreite der Vorläufer-Ionen auf 3 Da eingestellt. Die Kollisionsenergie ist eine vom Gerät als dimensionslose Größe angegebene Einheit und wird als relative Kollisionsenergie mit 40% eingestellt.

## 4.3 Derivatisierung von Peptiden

### 4.3.1 Acetylierung von primären Aminogruppen in Proteinen

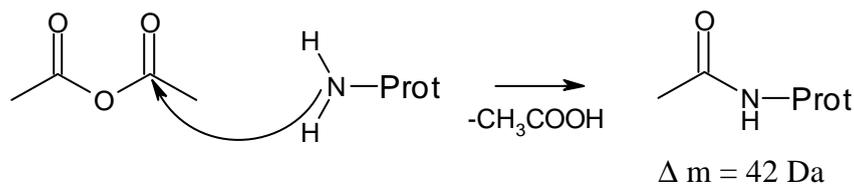


Abbildung 19: Acetylierung der primären Aminogruppen bei Proteinen.

<sup>IV</sup> Interner Geräteparameter, für den keine Dimension angegeben ist.

Lyophilisierte Peptidproben werden in 45  $\mu\text{l}$  konz. Essigsäure aufgenommen. Die Reaktion wird durch Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  Essigsäureanhydrid gestartet. Es wird für 2.5 h bei 37°C im Heizblock inkubiert. Anschließend werden die Proben lyophilisiert. Um eventuell auftretende Acetylierungen an Sauerstoff (Tyr, Ser) rückgängig zu machen, wird die lyophilisierte Probe in 50  $\mu\text{l}$  1M  $\text{NH}_3\text{OH}$  aufgenommen. Anschließend werden die Proben erneut gefriergetrocknet und bei -18°C im Kühlschrank aufbewahrt.

### 4.3.2 Bromnikotinylierung nach MIYAGI et. al.<sup>96</sup>

#### 4.3.2.1 Synthese von 5-Bromnikotinsäure-N-Hydroxysuccinimid (BrNA-NHS)

In einem Rundkolben werden 1.01 g 5-Bromnikotinsäure (BrNA) gelöst in 12.5 ml THF (frisch destilliert) vorgelegt. Unter Rühren bei 5°C werden nacheinander 1.13 g 1,3-Dicyclo-Hexyl-Carbodiimid (DCC) und 0.63 g N-Hydroxysuccinimid zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei 5°C für 20 h gerührt. Präzipitierter 1,3-Dicyclohexyl-Harnstoff wird abfiltriert. Das Lösemittel wird abgezogen und das Rohprodukt aus Essigsäure-Ethylester umkristallisiert. Die Umsetzung mit Brombenzoesäure wird entsprechend durchgeführt.

#### 4.3.2.2 Acylierung von primären Aminen mit BrNA-NHS

Lyophilisierte Peptidproben werden in 25 mM N-Ethylmorpholin/Essigsäure (pH 7.5) aufgenommen. BrNA-NHS wird mit einer Konzentration von 1.2 mg/ml in DMF gelöst und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß so vorgelegt (37°C), dass BrNA-NHS in einem 40fachen Überschuss vorliegt. Die Peptidlösung wird über 10 min portionsweise zugegeben, bevor die Reaktionsmischung für weitere 30 min bei 37°C inkubiert wird. Durch Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  Ameisensäure wird die Reaktion abgestoppt. Die Proben werden lyophilisiert.

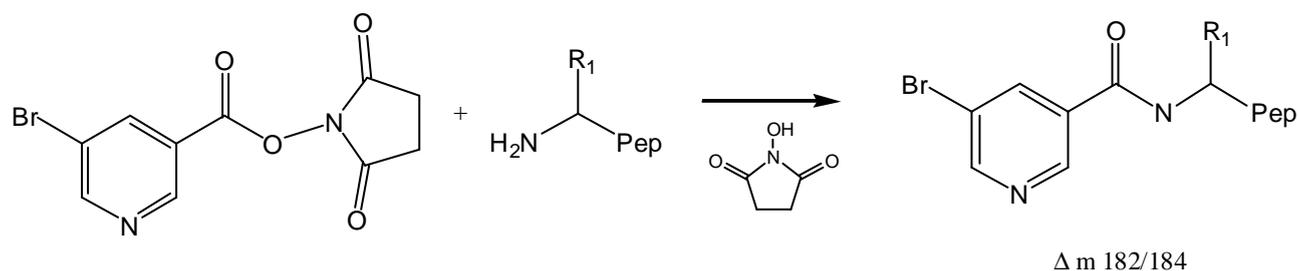


Abbildung 20: Derivatisierung mit BrNA-NHS an primären Aminen.

Für die massenspektrometrische Analyse werden die Proben in einem Volumen von 100  $\mu\text{l}$  0.1%iger Ameisensäure ( $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ , 1:1) aufgenommen und direkt in das ESI-MS injiziert.

### 4.3.3 Alkylierung primärer Amine mit (Bromo-ethyl)-triphenylphosphin

#### 4.3.3.1 Darstellung von (Bromo-ethyl)-triphenylphosphin<sup>113</sup> (Br-TPP)

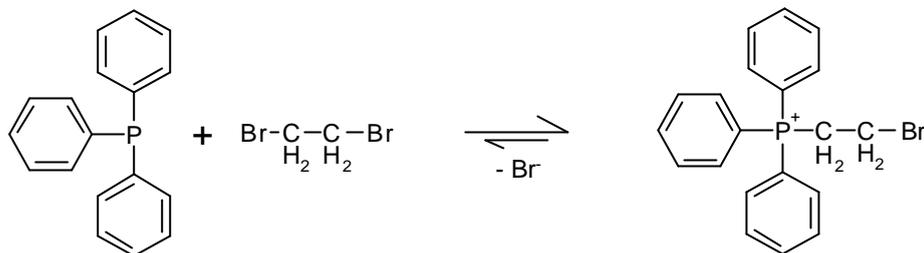


Abbildung 21: Reaktionsschema der Synthese von (Bromo-ethyl)-triphenylphosphin.

0.5 g (1 mmol) Triphenylphosphin (TPP) wird in einem 15fachen Überschuss (5.32 g) von 1,2-Dibromethan gelöst und 24 h bei 80 °C gerührt. Das Präzipitat wird über einem gesinterten Glasfilter gesammelt und mit Ether mehrmals gewaschen. Als Nebenprodukt entsteht 1-10% 2-Diphenylphosphino-ethyl-TPP als Salz. Ohne weitere Reinigung wird das Bromoethyl-TPP unter Stickstoff bei 4°C aufbewahrt.

#### 4.3.3.2 Alkylierung von primären Aminen mit (Bromo-ethyl)-triphenylphosphin (Br-TPP)

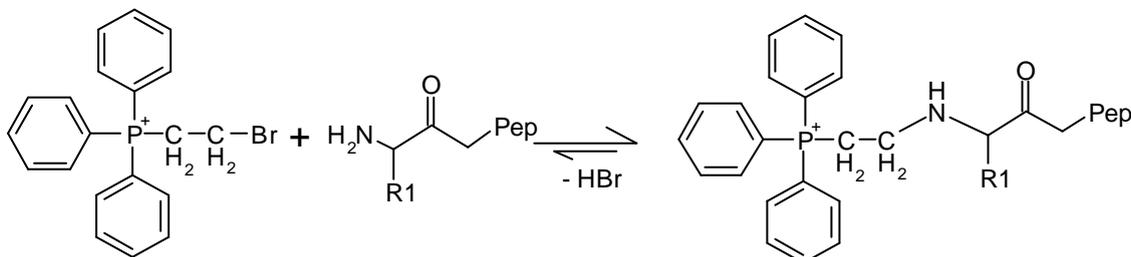


Abbildung 22: Reaktionsschema der Derivatisierung mit Br-TPP.

Das Peptid wird in TRIS-Pufferlösung (pH 9, 50 mM) in einer Konzentration von 0.5-2 nmol gelöst. Eine Br-TPP Lösung (10 nmol/μl in ACN) wird in 20fachem molarem Überschuss (Br-TPP über Peptid) hinzugefügt. Nach Vortexen wird die Lösung für 3 h bei 37°C gehalten. Das Peptidderivat wird über eine Festphasenextraktion (C<sub>18</sub>-Säule, BondElut) gereinigt. Je nach Volumenverhältnis (ACN/Puffer-Lösung) muss mit Wasser verdünnt werden, damit die Peptide nicht direkt von der Säule eluieren. Es wird mit 80% ACN eluiert. Anschließend wird das Eluat lyophilisiert.

Für die massenspektrometrische Analyse werden die Proben in einem Volumen von 100 μl 0.1%iger Ameisensäure (H<sub>2</sub>O:ACN, 1:1) aufgenommen und direkt in das ESI-MS injiziert.

#### 4.3.4 Acylierung primärer Amine mit Chloro-Sulfonylacetyl-Chlorid (CSAC)

Die Derivatisierungsreaktion<sup>114</sup> mit Chloro-Sulfonylacetyl-Chlorid (CSAC) wird unter wasserfreien Bedingungen durchgeführt. Zunächst wird das Peptid (1 nM) in 2 µl 0.02 M Sulfonylsäure (2 µl CSAC in 500 µl H<sub>2</sub>O) aufgenommen. Nach Trocknen und Rekonstitution der Peptide in 20 µl THF/Ethyl-Diisopropylamin (4:1) wird 2 µl einer 0.1 M CSAC-Lösung in THF zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 30 Sekunden gevortext. Nach 1-2 min Reaktionsdauer wird die Probe lyophilisiert.

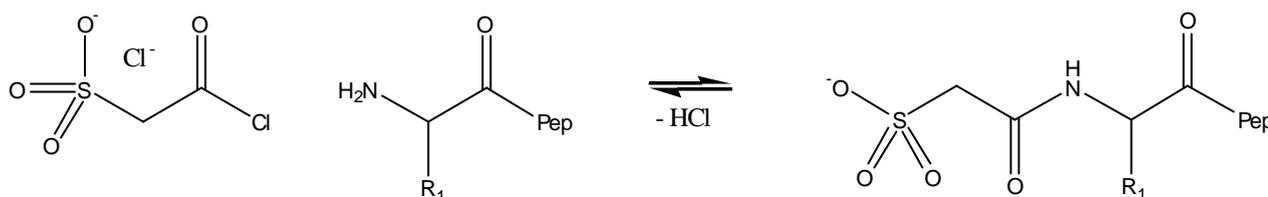


Abbildung 23: Reaktionsschema der Derivatisierung mit Chloro-Sulfonylacetyl-Chlorid (CSAC).

Für die massenspektrometrische Analyse werden die Proben in einem Volumen von 100 µl 0.1 %iger Ameisensäure (H<sub>2</sub>O:ACN, 1:1) aufgenommen und direkt in das ESI-MS injiziert.

### 4.4 MALDI-Proben

Um den Reaktionsverlauf bzw. die Reaktionsprodukte schnell zu identifizieren, werden MALDI-TOF-MS Spektren aufgenommen. Das MALDI-Ionisationsverfahren bietet sich hier zur schnellen Produktkontrolle für die durchgeführten Derivatisierungen an. Da die Toleranz gegenüber Puffersubstanzen und Salzen wesentlich größer ist als beim ESI-Verfahren, ist eine zeitaufwendige Probenentsalzung nicht notwendig. Der störende Einfluss von Detergenzien oder Harnstoff kann durch eine modifizierte Probenpräparation eliminiert werden<sup>115</sup>. Zudem ist die Probenpräparation und die benötigte Zeit für eine Messung kurz (15 bis 20 min).

#### 4.4.1 Probenvorbereitung

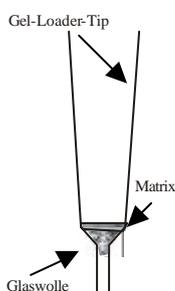


Abbildung 24: Festphasen-extraktionsröhrchen.

Die Proben müssen vor allem im Hinblick auf eine Probenzuführung über die Spritzenpumpe bei ESI-MS Messungen entsalzt werden. Die Proben werden auf eine äquilibrierte C-18 Säule der Firma CS aufgetragen. Alternativ zu den vorgefertigten Säulen können auch handgefertigte Säulen mit C-18 Material verwendet werden. Hierzu wird in einen mit silanisierter Glaswolle gestopften *Gel-Loader-Tip* ca. 10 mg mit Methanol aufgeschwemmtes C-18 Säulenmaterial gegeben.

Nach Waschen mit 60 µl Wasser (3x) wird mit 100 µl ACN/Wasser (80:20, v/v) eluiert. Das Eluat wird in der SpeedVac (Leybold, Hanau)

lyophilisiert und der Proteinrückstand für die Messung mit einer geeigneten Menge 0.1%iger-

Ameisensäure in H<sub>2</sub>O/ACN (1:1, v/v) (ESI) bzw. 2:1 (v/v) 0.1 %ige-TFA/ACN (MALDI) wieder aufgenommen.

#### 4.4.2 Target-Präparation

Die Probenvorbereitung erfolgt mittels Dünnschichtpräparation<sup>116</sup>. Auf jeden eingekreisten Präparationsplatz (*spot*) des Probenträgers (*Target*) wird 0.3 µl einer gesättigten, ethanolischen Lösung von Sinapinsäure (SA) aufgetragen. Durch das schnelle Verdampfen<sup>117</sup> (*fast evaporation method*) bilden sich kleinste Kristalle, die für die zweite Schicht als Kristallisationskeime dienen. Die Proben werden mit 0.1%iger Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser/ACN 2:1 (v/v) (Lösung 1) auf eine Endkonzentration von 0.1 - 10 nmol/ml verdünnt und mit dem gleichen Volumen einer gesättigten SA-Lösung in 0.1 % TFA Wasser/ACN 2:1 (v/v) (Lösung 2) kräftig durchmischt. Von der so angesetzten MALDI-Probe wird sofort ein Aliquot von 0.5 µl auf die vorgefertigte Dünnschicht aufgetragen. Das Trocknen der Probe erfolgt bei RT an der Luft (Abzug). Die Target-Präparation für MALDI-PSD erfolgt wie zuvor beschrieben, nur wird anstatt der Sinapinsäure  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure (CCA) verwendet, da diese Matrix Peptide besser zu ionisieren vermag und für eine bessere Fragmentierung sorgt.

#### 4.4.3 Aufnahme der MALDI-Spektren

Für die Messung von MALDI-Spektren muss das Gerät mit Proteinstandards (mit bekanntem Molekulargewicht) kalibriert werden. Unter externer Kalibrierung wird die Aufnahme eines Spektrums des Proteinstandards verstanden. Dieses Spektrum wird gespeichert und bei jeder Messung unter den gleichen Parametern können die Spektren von Proteinen mit unbekannter Masse nach ihrer Aufnahme kalibriert werden.

Eine verbesserte Kalibrierung der Spektren wird durch die interne Kalibrierung erreicht. Dazu werden nacheinander Standard und Probe auf demselben *spot* präpariert. Aufgrund unterschiedlicher Ionisationsfähigkeit können sich die Signale von Standard und Probe stark unterscheiden. Deshalb wird routinemäßig eine „quasi-interne“ Kalibrierung durchgeführt, bei der Standard und Probe auf zwei unterschiedlichen *spots* des Probenträgers präpariert werden. Die Abweichung zwischen den verschiedenen *spots* ist gering. Jedoch kann durch die Variation der Laserabschwächung die Ionisation von Standard und Probe individuell optimiert werden.

Die „quasi-interne“ Kalibrierung erfolgt je nach Größe des Analytmoleküls mit unterschiedlichen Standard-Proteinen. Die zu untersuchende Probe sollte im linearen Bereich der Kalibrierung liegen. Dazu wird z. B. eine Zwei-Punkte Kalibrierung mit intaktem Insulin ( $[M+H]^+$  5734.56 und  $[M+2H]^{2+}$  2867.78) durchgeführt, um die Reaktionsprodukte der Derivatisierung an den reduktiv alkylierten Einzelketten des Insulins zu verfolgen.

Zur Bestimmung der Adduktbildung bei Insulin genügt eine Ein-Punkt Kalibrierung mit dem Ausgangsmaterial, da die Massendifferenzen dann ausreichend präzise bestimmt werden konnten.

Für die kleineren Peptide und deren Derivate wird eine Kalibrierung mit Angiotensin II ( $[M+H]^+$  m/z 1046.54) durchgeführt. Da hier ein  $[M+2H]^{2+}$  nicht auftritt, wird für den zweiten Punkt der Kalibrierung das Matrix-Molekül-Ion von CCA  $[2M+H]^+$  m/z 379.09 verwendet. Für Angiotensin-Derivate, die eine Masse ( $< 2000$  Da) besitzen, die außerhalb des linearen Bereiches der Kalibrierung liegt, ist die Abweichung vernachlässigbar.

Die Geräteparameter sind abhängig von der Größe des zu messenden Moleküls. Die Differenz zwischen den beiden Spannungen IS1 und IS2 bestimmt das Beschleunigungs-Potential. Mit zunehmender Größe der Beschleunigungsspannung können größere Peptide/Proteine gemessen werden.

Durch die Einstellung *cut-off* können die Signale der Matrix-Moleküle im unteren Bereich des Spektrums minimiert werden. Dies ist bei Analytmolekülen hilfreich, die nur geringe Ionenausbeuten zeigen. In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten Geräteparameter bei MALDI-Messungen für verschiedene Proteinmessungen angegeben.

Tabelle 3.4.3: Geräteparameter bei MALDI-Messungen. Attenuation ist die Abschwächung des Lasers, je größer die Abschwächung, desto geringer die Laserleistung mit der das target bestrahlt wird.

Parameter	<i>Insulin</i>	<i>Angiotensin</i>	<i>PSD</i>
<b>Mode</b>	reflex	reflex	reflex
<b>Delay [ns]</b>	0	0	0
<b>cut-off [Da]</b>	1000	200	250
<b>Voltage [kV]</b>			
IS1	19	19	19
IS2	15	16	14
Ref	20	20	20
<b>Attenuation</b>	35-40	63	25-40

Die angegebenen Laserleistungen ( $N_2$ -Laser, 337 nm) sind nur gute Richtwerte. Eine Feinjustierung ist für jede Probe individuell nötig und sollte stets knapp über dem Schwellenwert (*threshold*) liegen. Dadurch wird verhindert, dass zu viele Matrix-Moleküle ionisiert werden und in das Flugrohr gelangen. Der Detektor wird durch die Matrixmoleküle gesättigt, was zu einer Verringerung der Auflösung des Analytsignals führt. Höhere Laserleistungen intensivieren das Signal, verringern aber gleichzeitig das Auflösungsvermögen.

#### 4.4.4 Aufnahme der MALDI-PSD Spektren

Ein MALDI-PSD Spektrum entsteht aus mehreren Einzelspektren, bei denen sukzessive die Reflektorspannung abgesenkt wird. Jedes Einzelspektrum stellt einen Teilbereich des Spektrums unterhalb des Molekül-Ions dar. Der Bereich des Tochter-Ionenspektrums, der durch ein Einzelspektrum abgedeckt wird, nimmt mit abnehmender Reflektorspannung ab. Dabei

verschlechtert sich das Signal/Rausch-Verhältnis. Durch Erhöhen der Laserleistung (Senken der *attenuation*) und der Reflektor-Detektorspannung kann die Signalausbeute verbessert werden. Von jedem Einzelspektrum werden 20-80 *scans* summiert und abgespeichert. Die Einzelspektren werden mit der Auswertungssoftware (XMASS) aneinandergefügt und geglättet.

## 4.5 ESI-Proben

Die Probenvorbereitung wurde schon unter 4.4.1 Probenvorbereitung beschrieben.

### 4.5.1 Aufnahme der ESI-Spektren

Das in der vorliegenden Arbeit benutzte Gerät (LCQ, Finnigan) besteht im Aufbau aus einer ESI-Quelle, zwei Oktapolen zur Ionenstrahlfokussierung, der eigentlichen Ionenfalle und dem Sekundärelektronenvervielfacher (Abbildung 25). Das Gerät kann im ESI-Modus oder mit einer APCI-Quelle (hohe Flussrate bei IC) betrieben werden. Die Oktapole dienen ausschließlich der Ionenstrahlfokussierung und sind an den Kollisionsexperimenten nicht beteiligt.

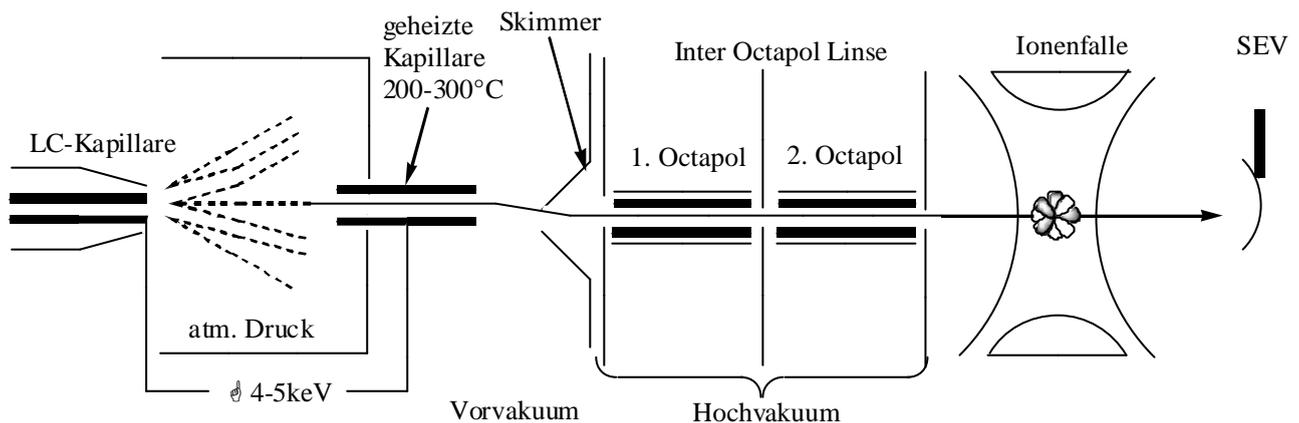


Abbildung 25: Schema des LCQ; SEV Sekundärelektronenvervielfacher als Detektor, der Skimmer ist ein wenig versetzt, damit keine Lösungsmittelmoleküle oder Salze in die Oktapole gelangen, der Ionenstrom wird "umgeleitet".

Die Kalibrierung der Ionenfalle erfolgt gemäß den Herstelleranweisungen mit einer Kalibrierungslösung, die den gesamten Messbereich ( $m/z$  150 bis 2000) abdeckt. Die eingebaute Software kalibriert das Gerät auf die Kalibrier-Substanzen (Coffein, 195.1, MRFA 525.4, Ultramark 1621<sup>118</sup>, 1022.1, 1122.1, .....1822.1).

Die Proteinkonzentration der Proben, die direkt über eine Spritzenpumpe zugeführt werden, sollte zwischen 5 und 100 nmol/ml betragen. Für eine Standardpräparation werden die entsalzten Proben mit 0.1%iger Essigsäure in H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1 (v/v) entsprechend verdünnt. Alternativ wird zur besseren Ionenausbeute bis zu 1%ige Ameisensäure und ACN benutzt.

Die Ionisationsparameter für die ESI-Quelle und die Oktapole werden mittels Automatischer Parameteroptimierung (*autotune*) auf die jeweilige Molekül-Ionenmasse des zu untersuchenden Vorläufer-Ions optimiert. Bei einer Verschlechterung der Signalausbeute muss die Parameteränderung zurückgenommen werden und eine manuelle Optimierung durchgeführt werden. Durch Erhöhung der Spannung an der ESI-Quelle (bis 4.75 kV) und Variation der Gasströme in der Quelle, lässt sich die Ionenausbeute bzw. die Kontinuität der Ionenbildung in der Quelle verbessern. Für die Durchführung von MS/MS oder MS<sup>n</sup>-Experimenten ist eine Ionenintensität von 10<sup>5</sup> - 10<sup>7</sup> Ionen nötig, um gute Ergebnisse zu erhalten. Bei einem guten Signal/Rausch-Verhältnis können auch noch von geringeren Ionenintensitäten aussagekräftige Fragment-Ionenspektren erhalten werden. Die Isolationsbreite (*isolation width*) für das Vorläufer-Ion muss so gewählt werden, dass der Molekül-Ionenpeak inklusive seiner Isotopenpeaks isoliert wird, damit es nicht zu Signalverschiebungen im Fragment-Ionenspektrum kommt. Dazu wird bei einer Kollisionsenergie von 0.1% zunächst die Isolationsbreite optimiert. Im gespreizten Massenbereich kann das Signal des Molekül-Ions auf seine Isotopen (Peakform) kontrolliert werden. Bei geringen Total-Ionen-Strömen (*Total Ion Current*, TIC) können zusätzlich weitere Ionen als Artefakte (Rauschen) selektioniert werden. Die Optimierung der Isolationsbreite ist für das Gelingen des Experimentes von entscheidender Bedeutung. Erst wenn das Vorläufer-Ion exakt isoliert ist, kann durch Erhöhung der Kollisionsenergie das eigentliche MS/MS-Experiment begonnen werden. Besonders bei Peptiden, die mit stabilen Isotopen gelabelt sind, muss die Isolationsbreite ausreichend groß gewählt werden, damit die in den Isotopen enthaltene Information nicht verloren geht. In der Regel sind Isolationsbreiten von 2-4 Da ausreichend.

#### **4.5.2 Bestimmung der optimalen Kollisionsenergie für MS/MS-Experimente in der Ionenfalle**

Um maximale Informationen aus den Fragment-Ionenspektren zu erhalten, ist es wichtig die Kollisionsenergie für jedes MS/MS-Experiment zu optimieren. Idealerweise nähert man sich von niedrigen Kollisionsenergien, bei denen das intakte Vorläufer-Ion zu sehen ist.

Durch sukzessives Erhöhen der relativen Kollisionsenergie (CE) erhöht sich der Anteil der Fragment-Ionen im Verhältnis zum intakten Precursor-Ion (Abbildung 26b). Bei einer CE von 20% ist das intakte Vorläufer-Ion noch der Basispeak (Abbildung 26a), ab einer CE von 25% verschwindet es. Durch weiteres Erhöhen der Kollisionsenergie lässt sich auch der Neutralverlust von Wasser  $[M+4H-H_2O]^{4+}$  (entspricht  $b_{29}^{4+}$ ) als Ion unterdrücken. Dieses Fragment enthält keine Sequenzinformationen, sondern kann bei der Identifizierung des C-Terminus immer angenommen werden. Für die C-terminale Aminosäure gilt als  $\Delta m$  zum Molekül-Ion immer die Residuenmasse zusätzlich eines Wassermoleküls.

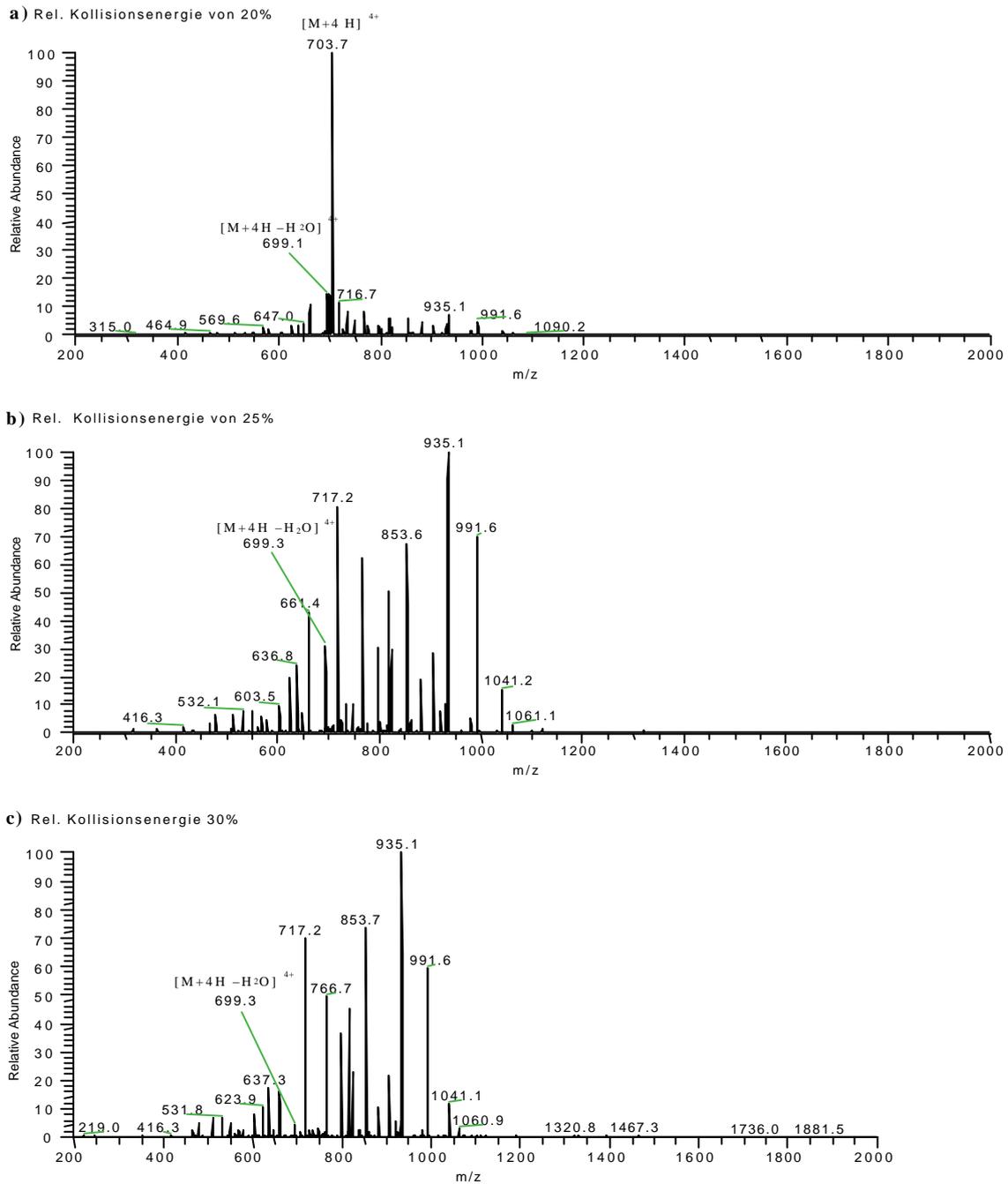


Abbildung 26: Tochter-Ionenspektren der carbamidierten B-Kette von Insulin bei verschiedenen relativen Kollisionsenergien.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Angiotensin I - ein Modellpeptid-

Für die Anwendbarkeit der Derivatisierungsreagenzien sollte das Fragmentierungsverhalten von Angiotensin I (Molekulargewicht 1296 Da) untersucht werden. Das Dekapeptid (DRVYIHPFHL) gehört zu den Gewebshormonen und wird als Zwischenstufe durch Abspaltung des C-terminalen Dipeptids durch das AngiotensinConverting Enzym (ACE) zum biologisch aktiven Angiotensin II (DRVYIHPF) umgesetzt. Angiotensin II ist ein stark blutdrucksteigerndes Peptidhormon<sup>119</sup>. Angiotensin I zeigt drei Ladungszustände (1+, 2+, 3+) unter ESI-Ionisationsbedingungen. Angiotensin I besitzt vier basische Zentren (N-Terminus, Arg, His, His) und ein Prolin in Position 7. Angiotensin I ist zur gezielten Derivatisierung am N-Terminus geeignet, da Nebenreaktionen mit der Amino-Gruppe des Lysins hier nicht auftreten können.

#### 5.1.1 Fragmentierung von Angiotensin I unter ESI Bedingungen

Unter MS<sup>1</sup>-Bedingungen ist das einfach geladene Molekül-Ion  $[M+H]^+$  der Basispeak ( $m/z$  1297.2). Das zweifach geladene Ion  $[M+2H]^+$  ist ausreichend intensiv, um MS/MS-Spektren aufzunehmen.

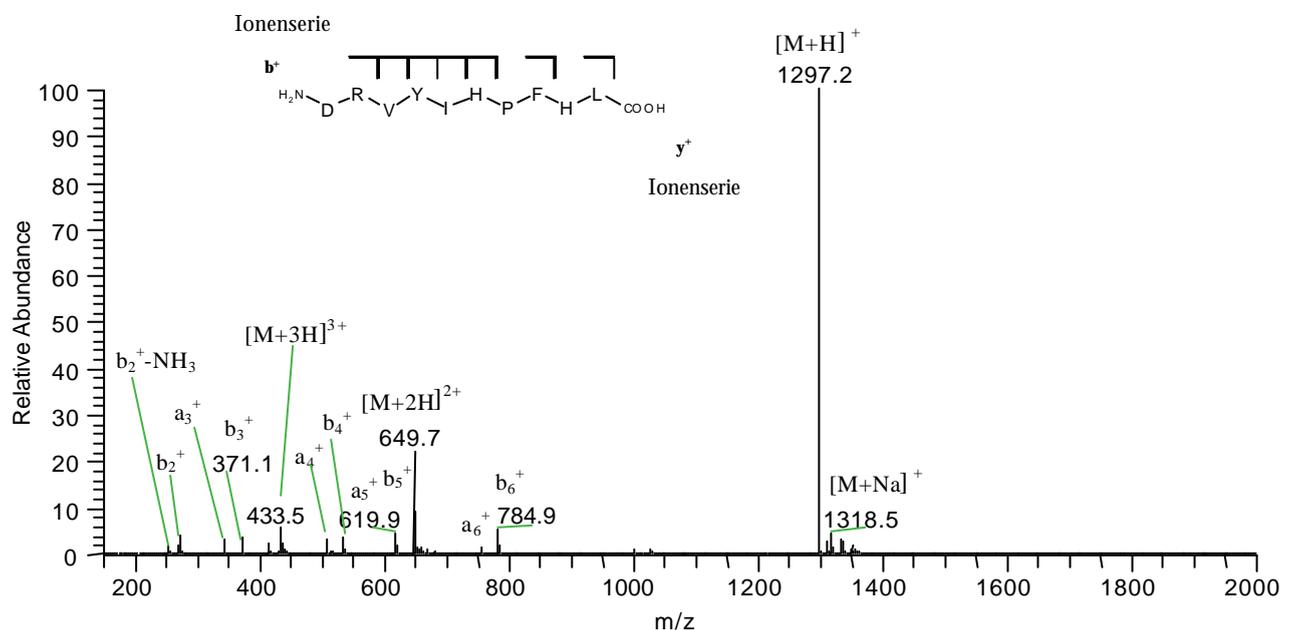


Abbildung 27: MS-Spektrum des unterderivatisierten Angiotensin I; Es lassen sich drei Ladungszustände detektieren. Das Signal von  $[M+3H]^{3+}$  ist um den Faktor 2 vergrößert worden. Durch Fragmentierungsreaktionen bei der Ionisation sind eine Reihe von b-Fragmenten entstanden (in-source-fragmentation), die anhand der Sequenz dargestellt sind.

Auffällig ist die „in-source“ Fragmentierung des Peptids, die zu einer Reihe von b-Fragment-Ionen ( $b_2^+$ - $b_9^+$ ) führt (siehe Abbildung 27). Das Fragment  $b_8^+$  fehlt, da dieses Fragment einen

Bindungsbruch hinter Prolin voraussetzen würde (siehe Abbildung 29). Die Bindung N-terminal vom Prolin (hier zwischen His und Pro) ist besonders instabil und fragmentiert leicht. Die Bindung C-terminal vom Prolin fragmentiert dagegen nicht unter Ladungsverbleib auf dem N-Terminus (Ausbildung eines b-Fragmentes).

Die b-Fragmente ( $b_3^+$  bis  $b_9$  außer  $b_8$ ) zeigen einen Verlust von Kohlenmonoxid ( $C=O \Delta 28$ ), was den a-Fragment-Ionen entspricht. Nur das  $b_2^+$  Fragment ( $m/z$  272.1) kann nicht Kohlenmonoxid ( $\Delta 28$ ) abspalten. Statt dessen wird an diesem Fragment ein Neutralverlust<sup>V</sup> von Ammoniak beobachtet ( $\Delta 17$ ,  $m/z$  255.6), der aus der Seitenkette des Arginins stammt. Daneben treten noch eine Reihe von y-Fragmenten auf ( $y_2^+$  bis  $y_5^+$ ), deren Intensität so gering ist, dass sie keine Aussagekraft besitzen.

Die Fragment-Ionen können bei einem „in-source“ Fragmentierungsmechanismus aus sämtlichen Ladungszuständen der Vorläufer-Ionen entstanden sein. Deshalb ist eine Aussage über die Ladungslokalisation und den Fragmentierungsmechanismus schwierig, selbst wenn das  $[M+H]^+$  Ion das intensivste Ion ist. Das Auftreten von y-Fragment-Ionen zeigt zumindest, dass von einer strengen Ladungslokalisation am N-Terminus oder in der Seitenkette des Arginins nicht ausgegangen werden kann. Zumindest ein Teil der Ladung gelangt über die Fragmentierungsreaktion auf die C-terminalen Bruchstücke des Peptids.

### 5.1.1.1 Fragmentierung des Molekül-Ions $[M+H]^+$ von Angiotensin I

Aus dem einfach geladenen Vorläufer-Ion entsteht als Hauptfragment ( $m/z$  1182.2). Dieses  $y_9^+$ -Fragment entsteht durch Abspaltung der N-terminalen Aminosäure, wobei die einzige Ladung auf dem Fragment verbleibt, das mit Arginin die höchste Protonenaffinität besitzt und somit der Ort der Ladungslokalisation ist. Der Bindungsbruch erfolgt über einen *charge-remote* Mechanismus, da die Ladung vor und nach dem Bindungsbruch am Arginin lokalisiert ist.

---

<sup>V</sup> Neutralverluste sind Fragmentierungen, bei denen keine Ladung auf dem Fragment verbleibt (z. B.  $NH_3$ ).

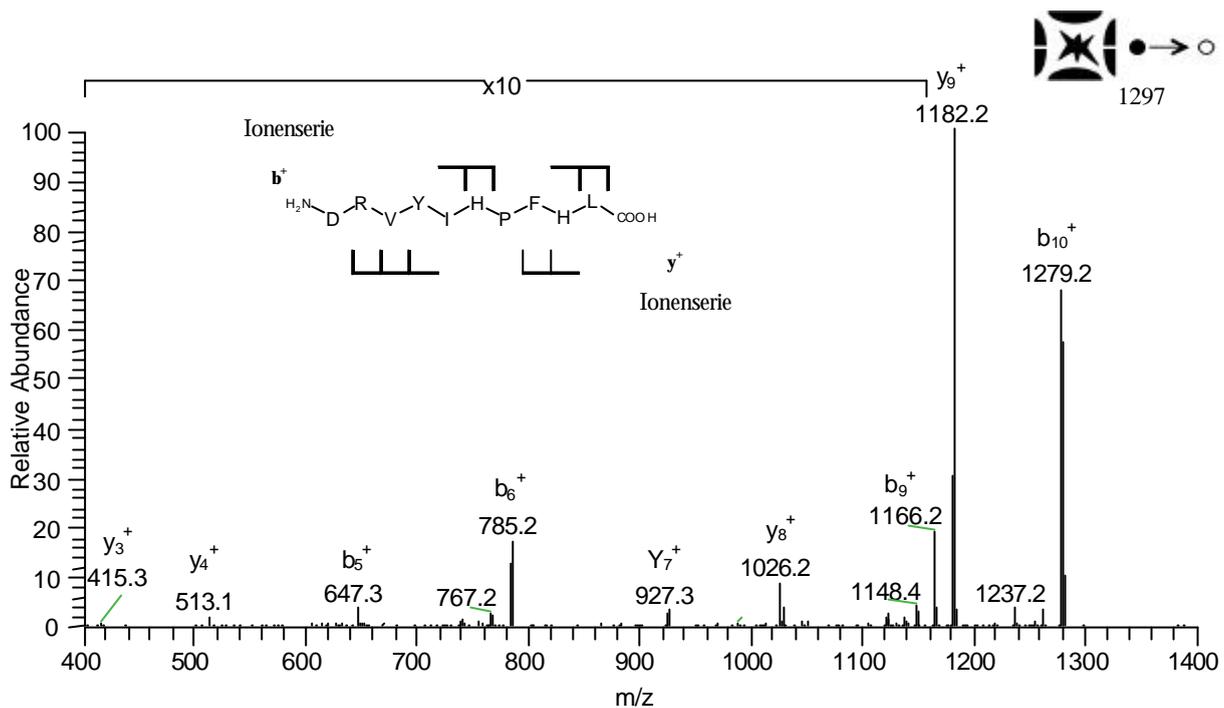


Abbildung 28: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum von Angiotensin I  $[M+H]^+$ . Die Intensitäten im  $m/z$ -Bereich bis ca. 1150 sind zehnfach vergrößert. Im Kasten ist die Sequenz mit den Bindungsbrüche dargestellt. Oberhalb der Sequenz sind b-Fragmente dargestellt, unterhalb y-Fragmente.

Weitere Fragmente der  $y$ -Serie sind nicht zu detektieren. Das  $y_4^+$ -Fragment ( $m/z$  513.4) entsteht durch den Bindungsbruch am Prolin<sup>VI</sup> (siehe Abbildung 29). Für die Lokalisation der Ladung kommt hier das Arginin nicht mehr in Frage, da es als Neutralverlust mit den ersten sechs Aminosäureresten (DRVYIH) abgespalten wird. Aufgrund der Intensitätsverhältnisse ist somit nur ein kleiner Teil der Ladung nach dem Bindungsbruch am Prolin auf dem C-Terminus lokalisiert. Die zu  $y_4^+$  korrespondierenden b-Fragmente ( $b_6$ ,  $b_5$ ,  $b_4$ ) sind ebenfalls als mäßig intensive Fragment-Ionen vorhanden. Neutralverluste von C=O werden nur noch für  $b_6^+$  beobachtet ( $m/z$  756). Als weitere b-Fragmente treten  $b_9^+$  und  $b_{10}^+$  auf, wodurch sich die C-terminale Aminosäure identifizieren lässt.

<sup>VI</sup> Die Bindung zwischen His-Pro wird fragmentiert.

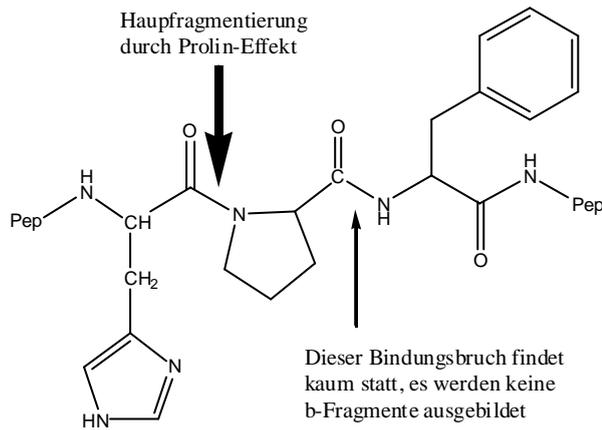


Abbildung 29: Prolin-Effekt. Die N-terminale Peptidbindung des Prolins fragmentiert leicht. Ein Bindungsbruch der C-terminalen Peptidbindung wird nicht durch Bildung eines b-Fragmentes bestätigt. Der Sequenzausschnitt zeigt die Aminosäuren HPF aus Angiotensin I.

induziert die  $y_4$ -Fragmentbildung. Die Entstehung des  $y_4^+$ -Fragments läuft nach einem *charge-induced* Mechanismus ab, da ein Proton auf den C-Terminus übertragen werden muss. Eine Protonierung des tertiären Stickstoffs am Prolin ist wegen der geringen Protonenaffinität unwahrscheinlich.

### 5.1.1.2 Fragmentierung des Molekül-Ions $[M+2H]^{2+}$ von Angiotensin I

Die Hauptfragmentierung des zweifach geladenen Vorläufer-Ions  $[M+2H]^{2+}$  ist der Bindungsbruch am Prolin unter Entstehung der beiden Fragment-Ionen  $b_6^+$  ( $m/z$  784.1, Basispeak) und  $y_4^+$  ( $m/z$  513.4). Dabei werden die beiden Ladungen auf die Fragmente verteilt. Die Intensität, mit der dieser *charge-separation* Mechanismus auftritt, zeigt, dass im Vorläufer-Ion eine Protonierungssituation vorliegen muß, die eindeutig den Protonentransfer auf das C-terminale  $y_4^+$ -Fragment bevorzugt.

Erstmals tritt mit geringer Intensität ein  $b_7^+$ -Fragment-Ion auf, welches nach den bisherigen Ergebnissen eher ungewöhnlich ist, da an der C-terminalen Seite von Prolin üblicherweise keine Fragmentierung stattfindet, bzw. diese deutlich erschwert ist (siehe Abbildung 29). Das im Fragment-Ionenspektrum von  $[M+H]^+$  (siehe Abbildung 28) intensive  $b_{10}^+$  Fragment fehlt. Das  $b_9^+$ -Fragment ist nun, ebenso wie das  $b_8^{2+}$ -Fragment zweifach geladen ( $b_8^{2+}$   $m/z$  515, überlagert von  $y_4^+$ ). Selbige zeigen noch einen Neutralverlust von C=O, was identisch ist mit der Ausbildung von  $a_9^{2+}$  ( $m/z$  569.6) und  $a_8^{2+}$  ( $m/z$  501). Das Ion  $a_8^{2+}$  ist deutlich intensiver zu detektieren, als das dazugehörige  $b_8^{2+}$  Ion. Die Fortsetzung der b-Fragment-Ionenserie wird durch einfach geladene Fragmente ( $b_8^+$  bis  $b_3^+$ ) beschrieben. Das  $b_5^+$ -Fragment ( $m/z_{(theor)}$  647.7) kann nicht detektiert

Das intensive  $y_9^+$  Fragment und die auftretenden b-Fragmenten sprechen dafür, dass die Ladung zwischen Arginin und Histidin lokalisiert ist. Durch den Bindungsbruch neben dem Aspartat und dem Verbleib der Ladung auf dem  $y$ -Fragment wird die Theorie vom bevorzugten Bindungsbruch neben Aspartat bestätigt. Ein  $b_1^+$  Ion konnte nicht detektiert werden. Die Hauptfragmentierung zum  $y_9^+$ -Fragment wird durch die bevorzugte Ladungslokalisierung am Arginin nach einem *charge-remote* Mechanismus eingeleitet. Ein Teil der Ladung gelangt durch die labile Prolin-Bindung auf die Peptidkette und

werden, da es in den Einstrahlbereich des Vorläufer-Ions fällt. Es spricht vieles dafür, dass maximal zwei Ladungen auf 8 Aminosäure-Residuen stabile Ionen ergeben.

Einige Ionen lassen sich noch über interne Fragmentierungen erklären. So sind die Ionen ( $m/z$  914.2, 767.2 und 669.2) der Fragmentierung des  $y_9^{2+}$  Ions (RVYIH $PF$ ,  $m/z$  591.8) zuzuordnen sind. Durch die zweite Ladung ist  $y_9^{2+}$  noch in der Lage weitere Bindungsbrüche vom C-Terminus einzuleiten. Dabei zeigt sich erneut, dass der Prolinbindungsbruch das intensivere Fragment (669.2) der inneren Fragment-Ionenserie ist.

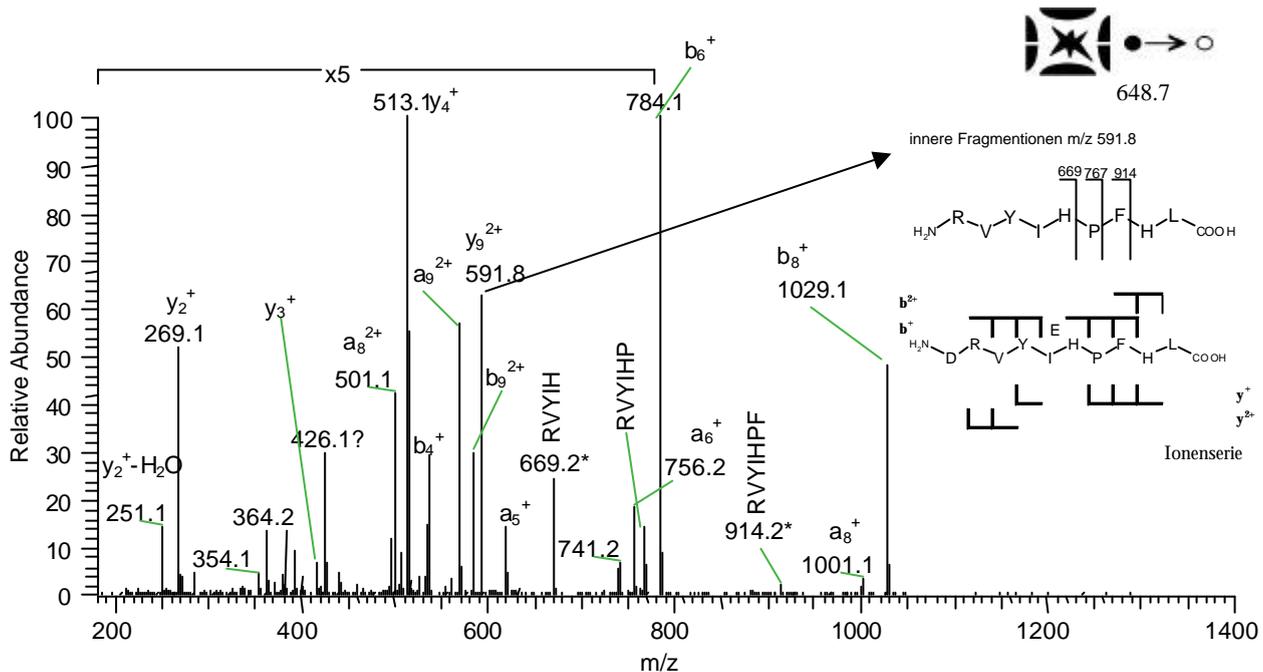


Abbildung 30: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum von Angiotensin I  $[M+2H]^{2+}$ . Die Intensitäten im  $m/z$ -Bereich bis ca. 770 sind fünfmal vergrößert. Die Entstehung der inneren Fragment-Ionen durch zweifachen Bindungsbruch aus dem  $y_9^{2+}$ -Fragment ist im Spektrum oben rechts dargestellt. Die Aminosäuresequenz darunter zeigt die Bindungsbrüche und den Verbleib der Ladung auf den Fragmenten.

Die breite Peakform des Ions 513.4 deutet an, dass mehrere Ionen dieser Masse zum Gesamtsignal überlagert werden. Die theoretischen Massen von  $y_4^+$  (513.283),  $y_8^{2+}$  (513.283) und  $a_8^{2+}$  (514.770) sind identisch, bzw. überlagern sich. Nach den bisherigen Spektren des Angiotensin I dürfte der Beitrag von  $y_4^+$  zur Gesamtintensität durch den Prolinbindungsbruch am größten sein, da durch die Ladungslokalisation am Arginin kein Proton in der Peptidkette zur Fragmentierung und somit zur Entstehung von  $y_8^{2+}$  zur Verfügung steht.

Auffallend intensiv ist noch das  $y_2^+$  Fragment ( $m/z$  269.1), dessen Intensität mit der Bildung des korrespondierenden  $b_8^+$ -Fragments korreliert ist. Interessant ist die Intensitätsverteilung der vier Hauptfragmente, bei der die  $y$ -Fragment-Ionen immer mit der Hälfte der Intensität der  $b$ -Ionenfragmente gebildet werden.

Tabelle 6: Die Ionenintensitäten der korrespondierenden *b*- und *y*-Fragment-Ionen aus Angiotensin I zeigen ein konstantes Verhältnis.

Korrelierende Fragmente		Intensitätsverhältnis
b-Fragment	y-Fragment	(b/y)
DRVYIH	PFHL	100 / 50
DRVYIHPF	HL	20 / 10

Für das zweifach geladene Angiotensin I sind die beiden Protonen so verteilt, dass zunächst das Arginin protoniert wird und dann die Peptidkette. Durch die feste Ladungslokalisation am Arginin hält sich das zweite Proton bevorzugt am C-Terminus auf, so dass jetzt der Prolin-Effekt die Hauptfragmentierung dirigiert und intensive Fragment-Ionen ( $b_6^+$  und  $y_4^+$ ) hervorbringt. Interne Fragment-Ionen entstehen durch die zweifache Protonierung des  $y_9^{2+}$ -Fragment-Ions. Aus der Serie innerer Fragment-Ionen ist das Fragment (m/z 669.2 RVYIH), welches durch den Bruch der Prolin-Bindung (siehe Abbildung 29) entsteht, das intensivste Fragment.

### 5.1.1.3 Fragmentierung des Molekül-Ions $[M+3H]^{3+}$ von Angiotensin I

Für die Fragmentierungsreaktionen stehen nun drei Protonen zur Verfügung, die über das Molekül verteilt sind und in den Fragment-Ionen stabilisiert werden müssen. Von den *ipso*-Fragmenten<sup>VII</sup> werden nur wenige Spezies erwartet, da die Ladungsdichte mit drei Ladungen pro 9 Aminosäuren sehr hoch ist. Als basische Zentren sollten Arginin, N-Terminus und die beiden Histidine mit einer festen Ladung gesättigt sein. Die räumliche Nähe von Arginin und N-Terminus lässt vermutlich nur die Protonierung des Arginins zu.

Tatsächlich lassen sich nur  $y_9^{3+}$  (m/z 389),  $y_6^{3+}$  (m/z 382) und  $b_9^{3+}$  (m/z 395) der *ipso*-Ionenserie zuordnen. Bis auf  $y_6$  lassen sich die dreifach geladenen Ionen auch noch als zweifach geladene Ionen  $b_9^{2+}$  und  $y_9^{2+}$  detektieren. Dieser Befund würde bedeuten, dass mit der Entstehung der zweifach geladenen Ionen  $b_9^{2+}$  und  $y_9^{2+}$  die dritte Ladung des Vorläufer-Ions auf den abgespaltenen Aminosäuren verblieben ist (Asp bzw. Leu).

Weiterhin intensiv ist der durch Prolin verursachte Bindungsbruch zwischen His-Pro mit zwei charakteristischen Fragmenten  $b_6^+$  (647.1) und  $y_4^+$  (513.7).

<sup>VII</sup> *Ips*o-Fragmente haben den gleichen Ladungszustand wie das Vorläufer-Ion.

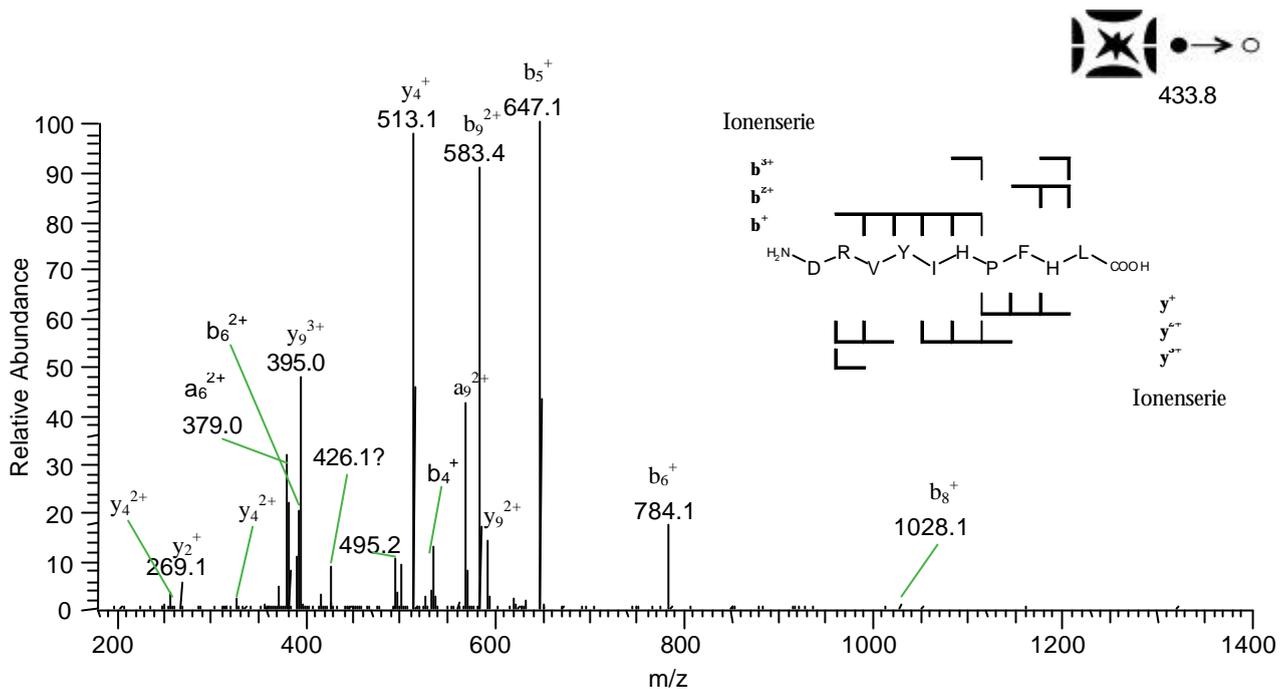


Abbildung 31: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum von Angiotensin I  $[M+3H]^{3+}$ . Die Sequenz zeigt die Entstehung der b und y-Fragment-Ionen in unterschiedlichen Ladungszuständen. Das Ion  $m/z$  426.1 ist einfach geladen, kann aber keiner Fragment-Ionenserie zugeordnet werden.

Auffallend ist, dass nahezu an allen Bindungen Fragmentierungen stattfinden (siehe Sequenz in Abbildung 31). Die drei Protonen haben also nicht die Möglichkeit sich örtlich zu lokalisieren, sondern sind nahezu über das gesamte Peptid gleichmäßig verteilt, so dass für die Intensitäten der Fragmentierungen die strukturellen Eigenschaften des Peptids in den Vordergrund treten. Durch das dritte Proton wird ein mobiles Proton erzeugt, dass nahezu an jeder Stelle des Peptids zu Fragmentierungen führt.

### 5.1.2 Acetylierung von Angiotensin I

Das MS-Spektrum zeigt die drei Ladungszustände ( $m/z$  1338.4,  $m/z$  670.3,  $m/z$  447.7) des einfach acetylierten Peptids. Das Peptid wurde erwartungsgemäß am N-Terminus acetyliert. Anzeichen für eine Überacetylierung lassen sich nicht finden. Lediglich einige Natrium- und Kalium-Addukt-Ionen mit geringer Intensität treten auf. Im Unterschied zum underivatisierten

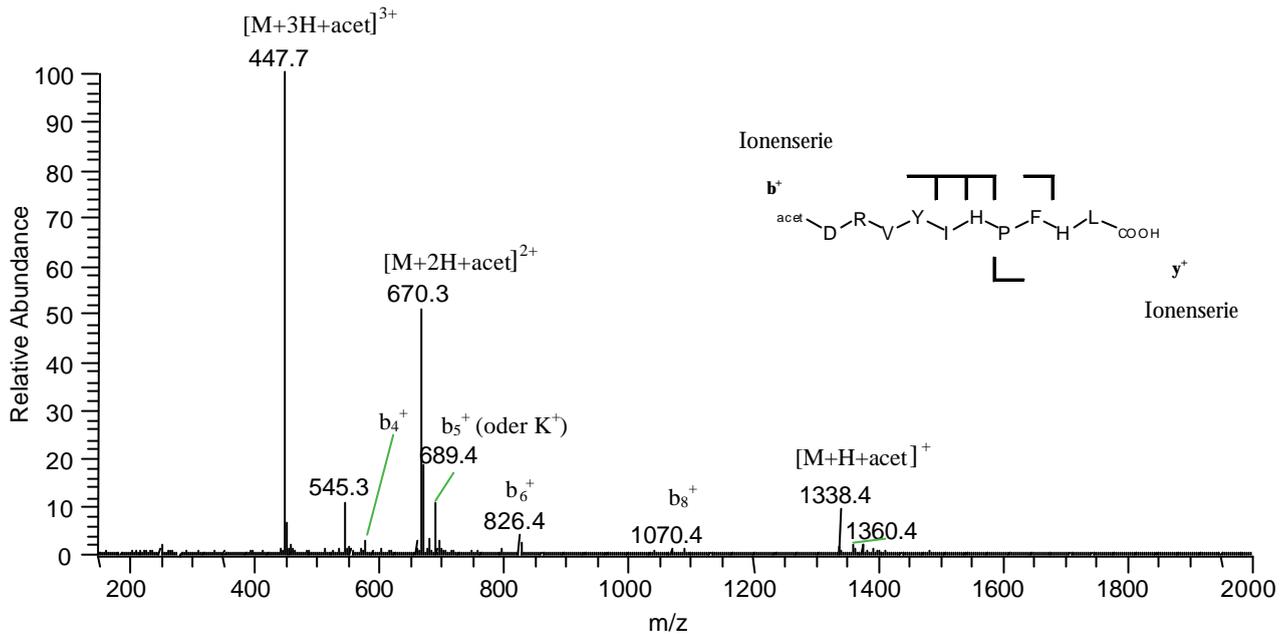


Abbildung 32: MS-Spektrum des acetylierten (acet) Angiotensin I mit "in-source" Fragmenten, die bei der Ionisation der Peptidmoleküle entstanden sind.

Peptid ist das dreifach geladene Molekül-Ion  $[M+3H+acet]^{3+}$  der Basispeak. Auch hier lassen sich bereits Fragmentierungen beobachten. Die  $b$ -Ionenserie ist von  $b_8$  bis  $b_4$  detektierbar. Als einziges  $y$ -Fragment ist  $y_4^+$  durch den Bindungsbruch am Prolin (His-Pro) entstanden.

#### 5.1.2.1 Fragmentierung des Molekül-Ions $[M+H]^+$ von acetyliertem Angiotensin I

Der Basispeak ist das  $y_9^+$ -Fragment ( $m/z$  1182.3), also die Abspaltung der N-terminalen derivatisierten Aminosäure (acetyliertes Aspartat). Weiterhin sind die  $y^+$ -Fragment-Ionen ( $y_9^+$  bis  $y_4^+$ ) detektierbar. Die Ionen der  $b$ -Serie ( $b_{10}^+$  bis  $b_4^+$ ) sind bis auf  $b_6^+$  (Prolin) detektierbar. Alle  $b$ -Fragment-Ionen zeigen einen Verlust von Kohlenmonoxid ( $a$ -Fragment-Ionen), wenn auch nicht mit der gleichen Intensität wie im underivatisierten Peptid.

Es entstehen deutlich mehr Ionen als ohne Derivatisierung. Die Hauptfragmentierungen hinter dem Aspartat und vor dem Prolin bestimmen aber weiterhin den Habitus des Spektrums.

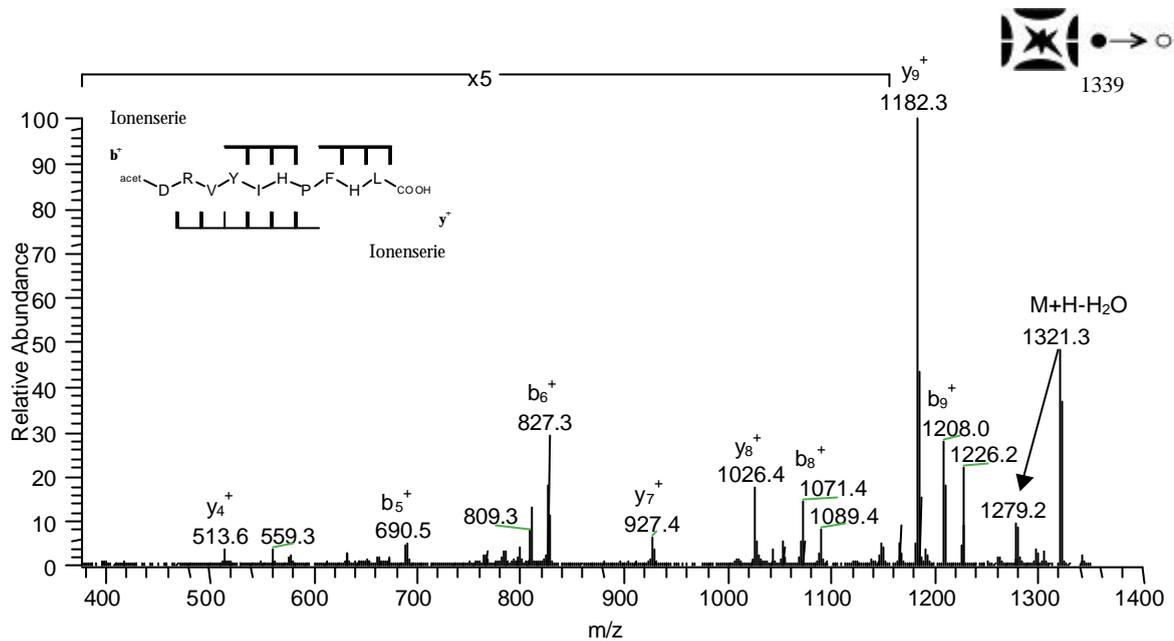


Abbildung 33: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des acetylierten Angiotensin I  $[M+H]^+$ .

Aus dem Neutralverlust<sup>VIII</sup> von Wasser (M+H-H<sub>2</sub>O; m/z 1321.3) wird mit schwacher Intensität der Verlust des Acetates (-42 Da) beobachtet (m/z 1279.2 siehe Pfeil in Abbildung 33). Die Acetylierung ist in der Ausbildung der weiteren Fragment-Ionen aber stabil, da sämtliche b-Fragmente mit einer um 42 Da erhöhten Masse detektiert werden. Die Fragmentierung des Derivats (Abspaltung der Acetylgruppe) ist möglicherweise auf den Aspartatrest zurückzuführen.

<sup>VIII</sup> Fragmente ohne Ladung, z. B. H<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> oder CO.



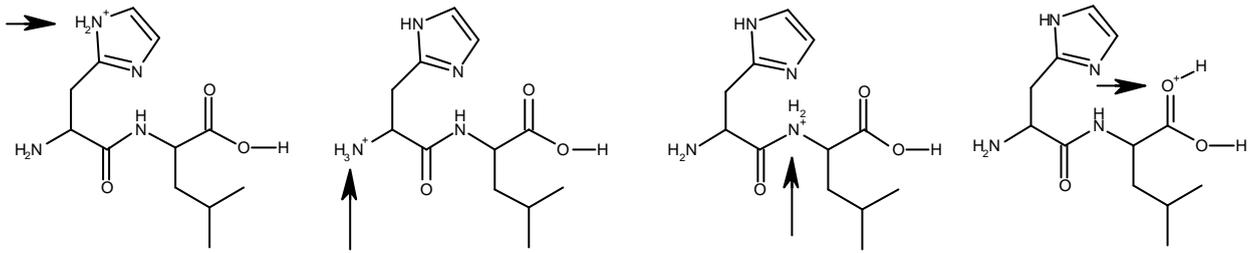


Abbildung 35: Strukturen des  $y_2^{2+}$ -Fragmentes. Die Pfeile zeigen die möglichen Protonierungsstellen des Fragment-Ions.

Aus dem zweifach geladenen  $y_9^{2+}$  Fragment entsteht noch eine innere Fragment-Ionenserie, die schon im Spektrum des underivatisierten Angiotensin I detektiert werden konnte. Auch aus dem acetylierten Angiotensin I lassen sich die Ionen wiederfinden. Das Fragment RYIHPFHL ( $m/z$  914) lässt sich wieder einfach detektieren, wohingegen das Fragment RYIHPF ( $m/z$  669) in den Einstrahlbereich des MS-Experimentes fällt und somit nicht stabilisiert sein kann bzw. weiter fragmentiert.

Durch die Acetylierung ist die Verteilung der Ionen über das Peptid verbessert worden, da sämtliche Bindungen in der Peptidkette zur Fragmentierung neigen (Abbildung 34). Die Intensität der Ionen wäre bei einer unbekanntem Sequenz allerdings sehr gering und könnte nicht eine einwandfreie Interpretation ermöglichen. Der Ladungsverbleib entscheidet dann über den Protonierungsgrad der Fragment-Ionenserien.

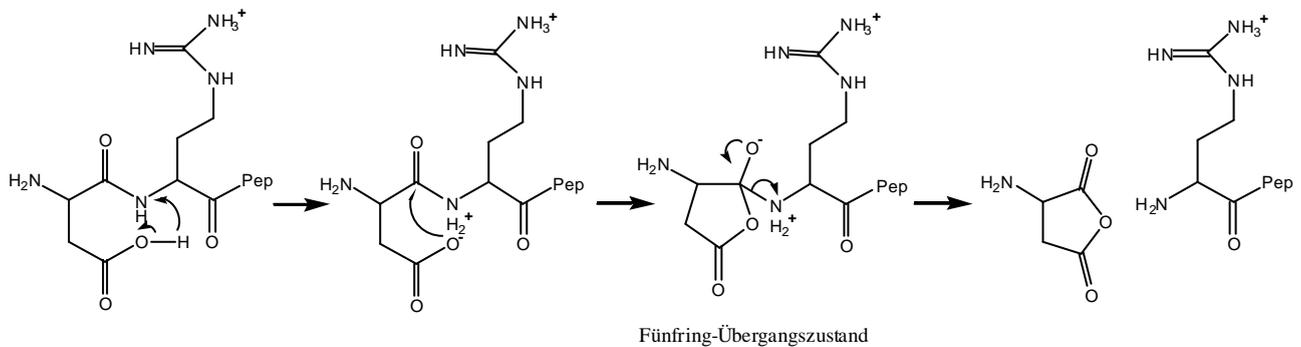


Abbildung 36: Fragmentierungsmechanismus durch Deprotonierung des Aspartats. Die am Arginin lokalisierte Ladung ist nicht an dem Bindungsbruch beteiligt.

Der Verbleib beider Ladungen auf dem  $y_9^{2+}$ -Fragment belegt, dass bei der durch Aspartat induzierten Fragmentierung kein Proton aus dem Ionisationsprozess des Moleküls involviert ist. Vielmehr entsteht der Bindungsbruch durch eine intramolekulare Übertragung des aciden Protons aus der Aspartat-Seitenkette auf den Amidstickstoff in der Peptidkette (siehe Abbildung 36). Die

deprotonierte Carboxylatgruppe bildet den Fünfring aus, und führt zu einem Neutralverlust<sup>X</sup> der ersten Aminosäure (Asp).

Der Mechanismus konnte dadurch bewiesen werden, dass nach einer Methylierung der Seitenkette von Aspartat ein Bindungsbruch nicht mehr möglich war<sup>120</sup>.

### 5.1.2.3 Fragmentierung des Molekül-Ions $[M+3H]^{3+}$ von acetyliertem Angiotensin I

Im Fragment-Ionenspektrum ist der Basipeak das Fragment  $b_5^+$  ( $m/z$  689.1). Somit ist eine Ladung im N-terminalen Bereich stabilisiert. Zum ersten Mal ist  $y_4$  intensiver als das korrespondierende  $b_6^+$  Fragment. Weiterhin ist das  $b_9^{2+}$ -Fragment (und  $a^{2+}$ ) recht intensiv; innere Fragment-Ionen, die aus  $y_9^{2+}$  entstehen könnten, werden nicht detektiert.

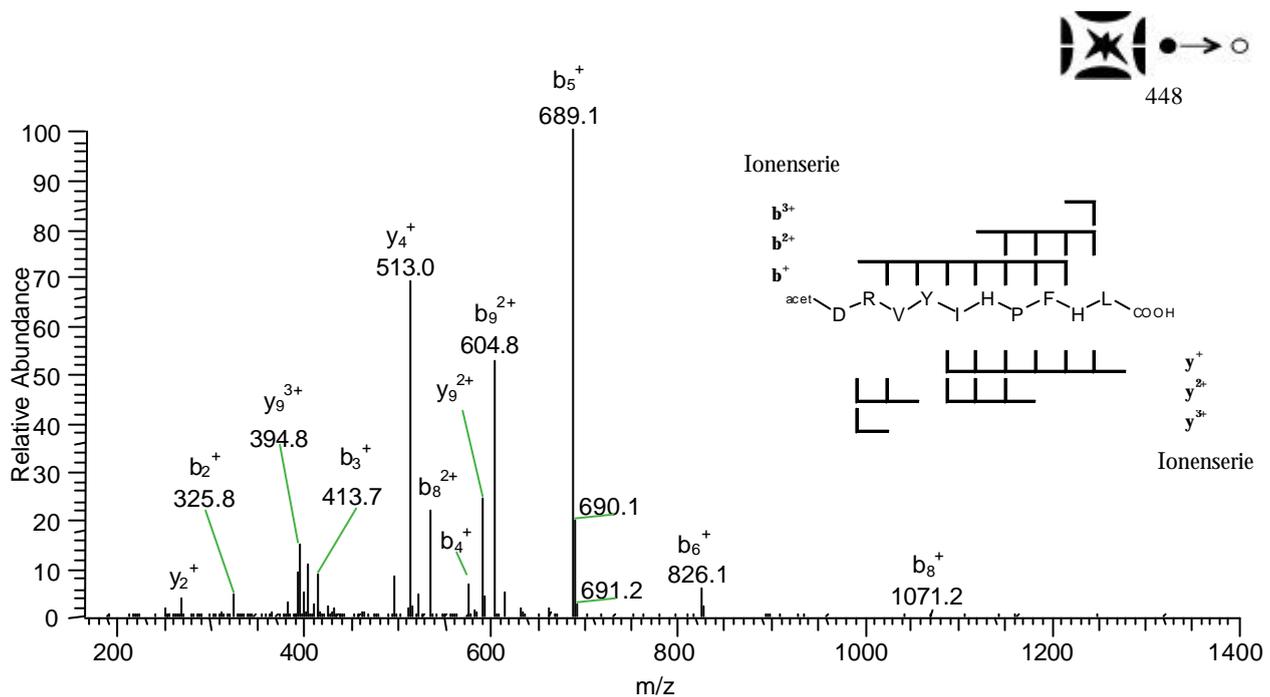


Abbildung 37: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des acetylierten Angiotensin I  $[M+3H]^{3+}$ .

Die Serie zweifach geladener  $y^{2+}$ -Fragmente ( $y_9^{2+}$  bis  $y_4^{2+}$ , wenig intensiv) gibt einen Hinweis auf die Ladungslokalisation. Das  $y_4^{2+}$  als kleinstes Fragment mit zwei Ladungen zeigt, dass sich mit geringer Intensität zwei Ladungen auf dem  $y_4$ -Fragment wiederfinden. Als Protonierungsstellen stehen das Histidin, der neue N-Terminus und der C-Terminus zur Verfügung.

Von der  $y^+$ -Serie ( $y_6^+$  bis  $y_1^+$ ) zeigt sich aufgrund des erweiterten Massenbereichs (Messung bis  $m/z$  125) auch das kleinste  $y$ -Fragment (bestehend nur noch aus Leu), was dafür spricht, dass am C-Terminus eine Ladung lokalisierbar ist.

<sup>X</sup> Fragmente ohne Ladung, hier ist es Asp

### 5.1.3 Sulfonylierung von Angiotensin I

Die Umsetzung zum sulfonylierten Angiotensin soll am N-Terminus eine feste negative Ladung einführen, so dass der Effekt des Arginins als Stelle bevorzugter Protonierung beeinflusst werden sollte. Das ESI-MS-Spektrum zeigt, dass die Derivatisierungsreaktion nicht vollständig abgelaufen ist. Die Intensitäten der Derivate sind allerdings ausreichend, um Fragment-Ionenspektren von den ein- und zweifach geladenen Molekül-Ionen anzufertigen. Das derivatisierte dreifach geladene Ion ( $m/z$  474.3<sub>(theor.)</sub>) kann im MS-Spektrum nicht detektiert werden. Durch die Derivatisierung (Acylierung des N-Terminus) wird die Basizität des Peptids herabgesetzt.

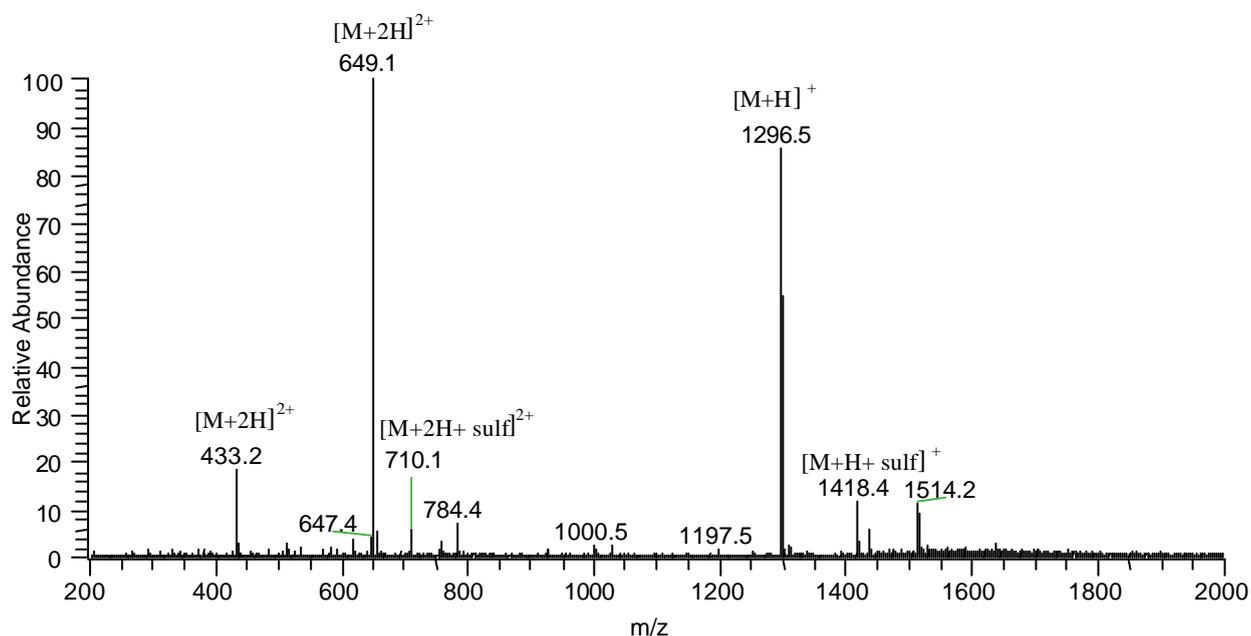


Abbildung 38: ESI-MS-Spektrum des bei der Sulfonylierung nur unvollständig umgesetzten Angiotensin I. Die intensivsten Ionen ( $m/z$  649.1 und  $m/z$  1296.5) gehören zu underivatisiertem Angiotensin I. Obwohl die Signale des sulfonylierten Angiotensin I ( $m/z$  710.1 und  $m/z$  1418.2) gering sind, lassen sich Fragment-Ionenspektren erhalten.

Von dem derivatisierten Peptid werden Fragment-Ionenspektren unter ESI-MS Bedingungen aufgenommen. Aus dem in der Reaktionskontrolle angefertigten Probenziel wird ein MALDI-PSD Spektrum generiert (siehe Abbildung 40). Da die in der Literatur beschriebenen Sulfonyl-Derivate<sup>103</sup> unter MALDI-PSD Bedingungen gemessen wurden, lassen sich die Fragmentierungen des einfach geladenen Molekül-Ions unter MALDI und ESI Bedingungen vergleichen. Da der MALDI-PSD Prozess auf Fragment-Ionen beschränkt ist, die nur eine Ladung tragen, lassen sich Vergleiche von mehrfach geladenen Molekül-Ionen nicht beschreiben.

### 5.1.3.1 Fragmentierung des Molekül-Ions $[M+H]^+$ von sulfonyliertem Angiotensin I unter ESI-MS Bedingungen

Im ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum zeigt sich als Basispeak das  $b_6^+$ -Fragment ( $m/z$  906.2), welches durch den Bindungsbruch am Prolin entstanden ist. Das korrespondierende  $y_4^+$ -Fragment ist nicht annähernd so intensiv wie  $b_6^+$ , was eine starke Ladungslokalisation am Arginin unterstützt. Nur ein geringer Teil der Ladung verbleibt nach der Fragmentierung auf dem  $y_4^+$ -Fragment.

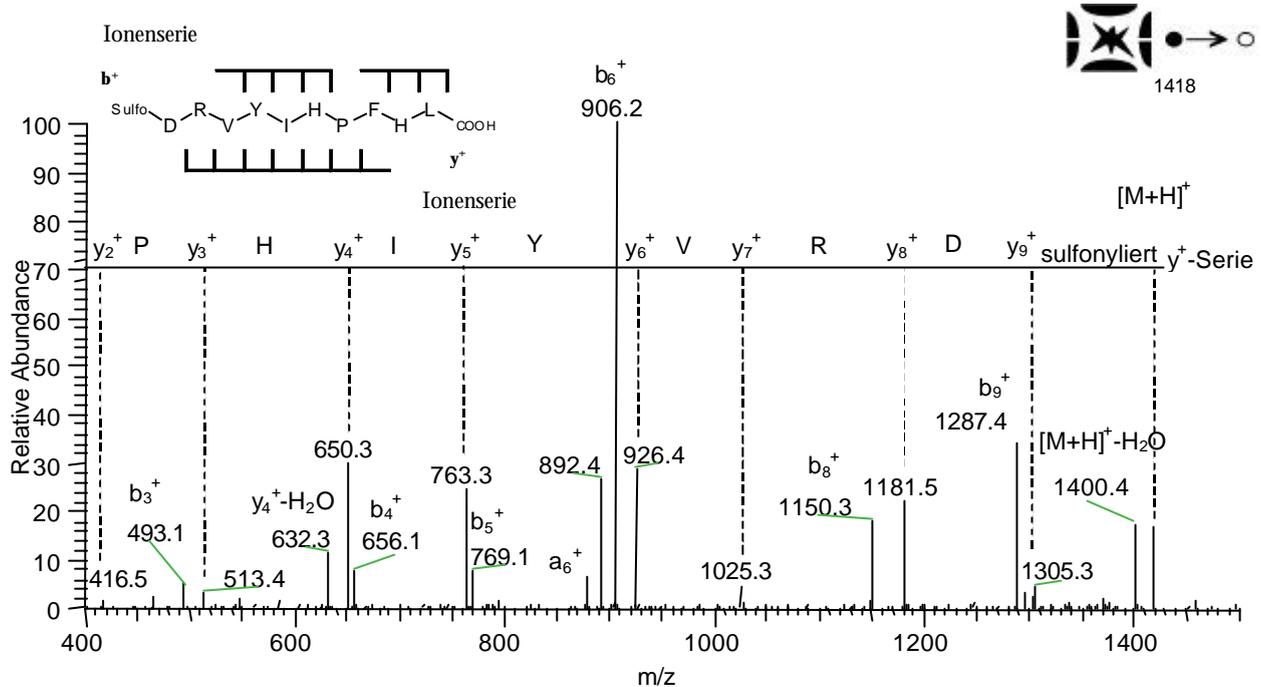


Abbildung 39: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des sulfonylierten Angiotensin I  $[M+H]^+$ . Die gestrichelten Linien markieren die Ionen der y-Serie (von denen einige noch H<sub>2</sub>O abspalten). Die Ionen der b-Serie sind deutlich zu erkennen und ergeben die gleiche Sequenzinformation.

Von der b-Ionenserie (b<sub>10</sub><sup>+</sup> bis b<sub>3</sub><sup>+</sup>) fehlt lediglich das b<sub>7</sub><sup>+</sup>-Ion (Prolin). Verluste von C=O zeigen nur die Fragmente b<sub>3</sub><sup>+</sup> und b<sub>5</sub><sup>+</sup> (a<sub>3</sub> bzw. a<sub>5</sub>).

Das Spektrum besitzt eine nahezu gleichmäßige Intensitätsverteilung für die Ionen der y-Serie (y<sub>9</sub><sup>+</sup> bis y<sub>3</sub><sup>+</sup>). Die Abspaltung des Derivats stellt nicht die Hauptfragmentierung dar, zeigt aber bei  $m/z$  1296.5 ein detektierbares Signal, so dass aufgrund der bekannten Masse der Acetylsulfonyl-Gruppe das erste y-Fragment direkt identifiziert werden kann ( $m/z$  1296). Obwohl das Signal nur mäßig intensiv ist, lassen sich von dort aus die restlichen y-Fragmente wegen ihrer guten, gleichmäßigen Intensität identifizieren (siehe Abbildung 39).

Im Vergleich zu den übrigen Spektren des einfach geladenen Angiotensin I (bzw. dessen Derivat) besitzt das y<sub>9</sub><sup>+</sup>-Fragment eine geringe Intensität. Durch die Einführung einer negativen Ladung am N-Terminus, bzw. in unmittelbarer Nähe des Aspartats, ist die Reaktion des Aspartats (siehe

Abbildung 36), die zum Bindungsbruch Asp-Arg führt, fast vollständig unterbunden. Die Erklärung dafür wird in Kapitel 5.1.4 gegeben.

### 5.1.3.2 Fragmentierung des Molekül-Ions $[M+H]^+$ von sulfonyliertem Angiotensin I unter MALDI-PSD Bedingungen

Aus dem metastabilen Zerfall des Sulfonsäurederivats unter MALDI-Bedingungen ergibt sich ein Fragment-Ionenspektrum, welches sowohl y-Fragmente als auch b-Fragmente aufweist. Die y-Fragment-Ionenserie lässt sich bis auf  $y_1^+$  detektieren. Sogar  $y_3^+$  als ungewöhnliches Fragment (C-terminal zu Prolin) wird beobachtet. Aber auch die b-Fragment-Ionenserie ( $b_2$  bis  $b_9$ ) zeigt intensive Fragment-Ionen. Es lassen sich noch zwei innere Fragment-Ionen detektieren ( $m/z$  382  $PFH^+$ ,  $m/z$  519  $HPFH^+$ ). Der Basispeak ist  $y_5^+$ , was für eine starke Lokalisation der Ladung auf dem C-terminalen Bereich des Peptids spricht, da gleichzeitig das korrespondierende  $b_5^+$ -Fragment intensitätsschwach ist.

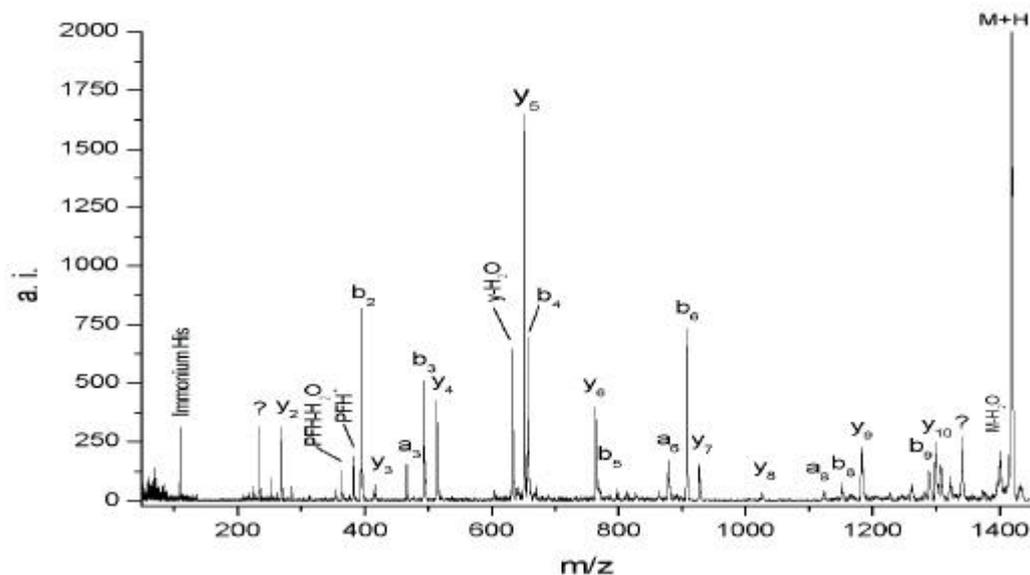


Abbildung 40: MALDI-PSD Spektrum des sulfonylierten Angiotensin I; a. i. : Absolute Intensitäten.

Das gleiche Ion zeigt unter ESI-MS ein verändertes Fragmentierungsverhalten bezüglich der Intensitäten der Fragmente (siehe Abbildung 41). Auffallend ist das unter ESI-Bedingungen  $b_6^+$  der Basispeak ist unter MALDI-Bedingungen jedoch  $y_5^+$ . Beide Fragmente besitzen das His an Position 6, was auf eine Lokalisation der Ladung schließen lässt. Je nach Ionisationsbedingungen scheinen die beiden benachbarten Bindungen unterschiedlich stark favorisiert für einen Bindungsbruch. Unter MALDI-Bedingungen ist die Ile-His und unter ESI-Bedingungen die His-Pro Bindung die labilere Bindung.



Fragment  $b_7^+$  nicht zu detektieren (Prolin-Effekt). Auf dem korrespondierenden  $y_3^+$ - Fragment ( $m/z$  416) scheint sich aber eine Ladung stabilisieren zu lassen.

Durch die zweite Ladung ist hier  $b_6^+$  nicht mehr das dominierende Fragmentierungsprodukt. Einige zweifach geladene Fragment-Ionen ( $b_{10}^{2+}$ ,  $b_9^{2+}$  und  $y_9^{2+}$ ) dokumentieren eine gewisse Stabilisierung von zwei Ladungen auf dem Peptid. Aber auch hier ist die Intensität von  $y_9^{2+}$  gering, wenn auch gegenüber dem einfach geladenen Sulfonsäurederivat erhöht.

Verluste von C=O zeigen hier  $b_3^+$  und  $b_2^+$  sowie die zweifach geladenen b-Ionen ( $a_9^{2+}$  und  $b_{10}^{2+}$ ). Insgesamt finden intensive Fragmentierungen an beiden Enden des Peptids statt. Die Fragmente  $b_3^+$  (Basispeak) und  $b_2^+$  sind außergewöhnlich intensiv.

#### 5.1.4 Einfluss der Acetylierung und der Sulfonylierung auf das Fragmentierungsverhalten von Angiotensin I

In der Übersicht sind die relativen Ionen-Intensitäten der Fragment-Ionen gegen die Aminosäurepositionen aufgetragen dargestellt. Die Intensitäten verschiedener Ladungszustände der Fragment-Ionen sind addiert worden. Für die sulfonylierten Derivate konnten nur die Ladungszustände +1 und +2 (ESI-MS<sup>2</sup>) detektiert und analysiert werden.

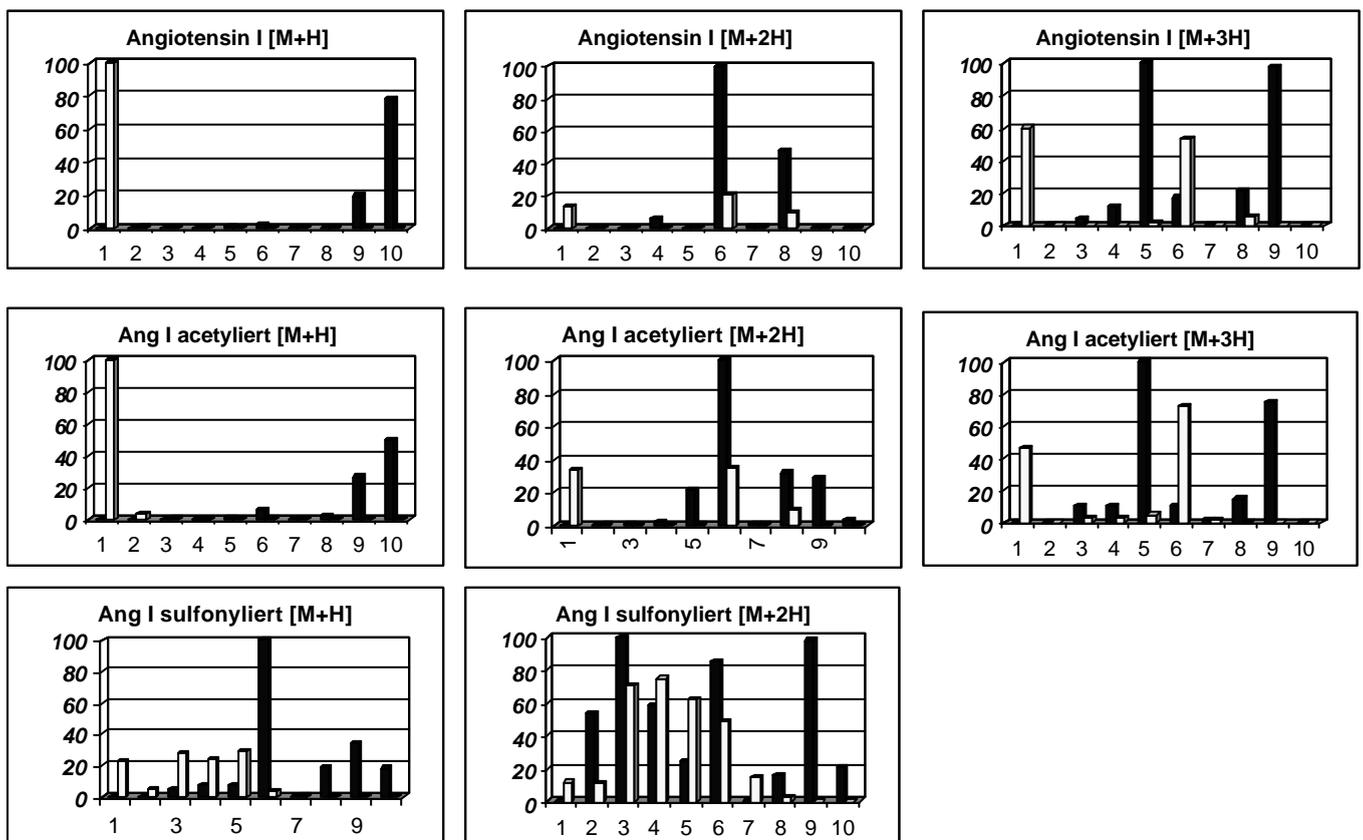


Abbildung 43: Vergleich der Fragmentierungen (bzw. Intensitäten) der Angiotensin I Derivate mit dem underivatisierten Angiotensin I. Dunkle Balken stellen die Intensitäten der b-Fragmente und helle Balken die der y-Fragmente dar. Oberste Reihe: Angiotensin I in den Ladungszuständen (+1, +2, +3), Mittlere Reihe: acetyliertes (acet) Angiotensin I (Ang I) (+1, +2, +3), Unterste Reihe: sulfonyliertes Angiotensin I (Ang I) in den Ladungszuständen (+1, +2).

Aus den Diagrammen lassen sich direkt Informationen über die relative Intensität der Fragment-Ionen, bevorzugte Fragmentierungen, oder das ausschließliche Auftreten einer Ionen-Serie ablesen. Aussagen über Fragmentierungsmechanismen sind nur bedingt möglich.

So lassen sich *charge-separation* Mechanismen daran erkennen, dass an einer Aminosäure sowohl das b- als auch das y-Fragment intensive Signale besitzen. Bei mehrfach geladenen Vorgänger-Ionen entstehen mehrfach (oder n-1fach) geladene Fragment-Ionen, die aber in den Diagrammen addiert werden.

Für den einfachen Ladungszustand des Peptids lassen sich ohne Derivatisierung intensive Fragmentierungen an beiden Enden des Peptids erkennen. Dabei sorgt zum einen das N-terminale Aspartat für Fragment-Ionen (Basispeak), zum anderen gibt es Bindungsbrüche am C-Terminus, die zu einfach geladenen b-Fragmenten führen. Ob dabei die Ladung zu einem Teil auf dem y-Fragment verbleibt kann nicht beantwortet werden, da der Bereich des Spektrums nicht groß genug ist (27% Regel).

#### **a) Einfluss der Acetylierung auf das Fragmentierungsverhalten von Angiotensin I**

Durch die Acetylierung entstehen im einfachen Ladungszustand mehr Fragment-Ionen als im Spektrum des underivatisierten Angiotensin I. Die Intensität der aus Fragmentierungen in der Mitte des Peptids entstandenen  $b^+$ -Fragmente ist gering ( $b_6$ ,  $y_8$ ). Das  $b_6^+$ -Fragment entsteht durch den Bindungsbruch von His-Pro. Dieser Bindungsbruch ist im Ladungszustand  $[M+2H]^{2+}$  des underivatisierten und im acetylierten Angiotensin I der Basispeak (siehe Abbildung 43, Mitte oben und darunter). Bei zweifacher Protonierung ist davon auszugehen, dass sich ein Proton am Arginin befindet und das andere auf dem Peptidrückgrat oder einem Histidin. Wenn sich durch die Acetylierung das  $b_6^+$ -Fragment aus dem einfach geladenen Vorläufer-Ion bildet, so ist dies ein Indiz dafür, dass das Proton nicht mehr ausschließlich am Arginin lokalisiert ist, sondern zum Teil auf dem Peptidrückgrat den Bindungsbruch His-Pro initiiert (*charge-site-initiated* Mechanismus).

#### **b) Einfluss der Sulfonylierung auf das Fragmentierungsverhalten von Angiotensin I**

Durch die Sulfonylierung am N-Terminus ändert sich das Fragmentierungsverhalten jedoch entscheidend. Es entstehen eine Reihe von y-Ionen, die den gesamten N-Terminus charakterisieren (siehe Abbildung 43, untere Reihe). Daneben sind die Intensitäten für die b-Fragmente zur Charakterisierung des C-Terminus ebenfalls intensiv. Lediglich die Fragmentierung C-terminal zum Prolin (Bindung Pro-Phe) fehlt.

Für die Spektren der zweifach geladenen Molekül-Ionen gilt gleiches. Durch die Sulfonylierung lassen sich nahezu komplette Fragment-Ionenserien für b- und y-Ionen erzeugen. Besonders intensiv sind die kleinen b-Ionenfragmente. In der Literatur ist der Einfluss der Sulfonylierung mit

einer ausschließlichen Bildung von  $\gamma$ -Fragmenten beschrieben. Dieses Beispiel zeigt gegenteilig, dass auch b-Fragment-Ionen gebildet werden können.

### c) Einfluss des Ladungszustandes auf das Fragmentierungsverhalten von Angiotensin I

Betrachtet man den Ladungszustand und seinen Einfluss auf den Habitus der Spektren, so lässt sich für das underivatisierte Peptid und das acetylierte Peptid feststellen, dass die Hauptfragmentierung sich mit höherem Ladungszustand auf die Mitte des Peptids verschiebt. Der Bindungsbruch am Prolin (His-Pro) ist bei zwei vorhandenen Ladungen am intensivsten, was durch die Fragmente  $b_6^+$  und  $y_4^+$  belegt wird. Dies legt nahe, dass sich die Protonen auf dem Arg und dem His an Position 9 befinden. Die Fragment-Ionenspektren der dreifach geladenen Molekül-Ionen weisen nicht mehr das  $b_6^+$ -Fragment (Prolin-Fragment), sondern das  $b_5^+$ -Fragment als intensivstes Fragment auf. BOYD<sup>121</sup> erklärt dies mit abstoßenden Coulombkräften, die das dritte Proton durch die fixierten Ladungen an den Arg und His (Position 9) in die Mitte des Peptids dirigieren. Dadurch kommt die intensive Fragmentierung der Ile-His Bindung zustande.

Für den ebenfalls untersuchten<sup>121</sup> Ladungszustand +4 fanden sich nur Immonium-Ionen<sup>XI</sup> und interne Fragmente, da größere Fragmente aufgrund der Ladungsdichte vermutlich instabil waren und somit weiterer Fragmentierung unterlagen.

### d) Einfluss des Sulfonsäure-Derivates und der Acetylierung auf die Fragmentierung durch Aspartat

Durch die Einführung des Sulfonsäure-Derivates ist die zuvor intensive Fragmentierung unter Ausbildung von  $y_9^+$  oder  $y_9^{2+}$  deutlich vermindert (nur noch 10% rel. Intensität). Für diese Fragment-Ionenbildung wird der plausible Mechanismus des Protonentransfers von der Aspartat-Seitenkette auf den Amid-Stickstoff des Peptidrückgrates angenommen (siehe Abbildung 36 und Abbildung 44). Durch das Sulfonyl-Acetyl Derivat wird dem Aspartat ein zweites positiviertes Carbonyl-Kohlenstoffatom angeboten. Betrachtet man die möglichen Reaktionswege, so fällt auf, dass sich beim Angriff auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Acetyl-Sulfonyl Derivates ein Sechsring ausbildet, welcher stabiler ist als der Fünfring des Säureanhydrids. Über den Sechsring-Übergangszustand (siehe Abbildung 44) lagert sich das Molekül um, ohne dass die Bindung Asp-Arg fragmentiert.

---

<sup>XI</sup> Ionen, die aus einer Aminosäure bestehen

Diese Umlagerung könnte der Grund für die gleichmäßigere Fragmentierung des Sulfonsäure-Derivates im Vergleich zum underivatisierten Angiotensin I sein.

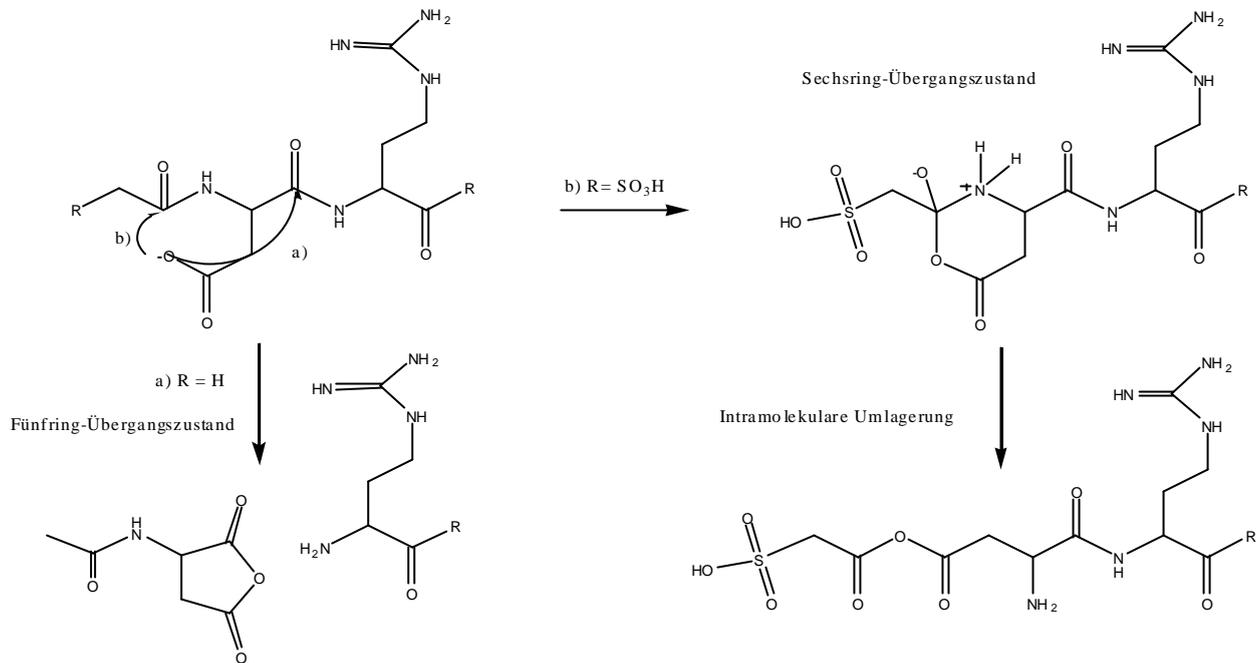


Abbildung 44: a) Fragment-Ionenbildung durch Aspartat; b) Verhinderung der Fragmentierung durch intramolekulare Umlagerung.

Durch die Acetylierung mit Essigsäureanhydrid wird ebenfalls ein zweites Carbonyl-Kohlenstoffatom eingeführt, was in Konkurrenz zur ursprünglichen Fragmentierung tritt. Dieses scheint aber die Fragmentierung nicht zu beeinflussen, da weiterhin intensive  $\gamma_9$ -Fragmente auftreten (siehe Abbildung 43, mittlere Reihe links und Mitte). Das Carbonyl-Kohlenstoffatom ist durch die Acetylierung nicht ausreichend positiviert, so dass bevorzugt die Reaktion über den Fünfring-Übergangszustand abläuft.

## 5.2 Einfluss von Iodessigsäure und Iodacetamid bei der reduktiven Alkylierung des Rinder-Insulins auf das Fragmentierungsverhalten

Ziel des Versuches war es das Fragmentierungsverhalten der beiden Derivate zu untersuchen. Dazu wurden die Reaktionsprodukte der reduktiven Alkylierung mit Iodessigsäure und Iodacetamid in einem Säulenlauf aufgetragen. In einem LC-MS/MS-Experiment sollen zudem mögliche Unterschiede im Fragmentierungsverhalten untersucht werden.

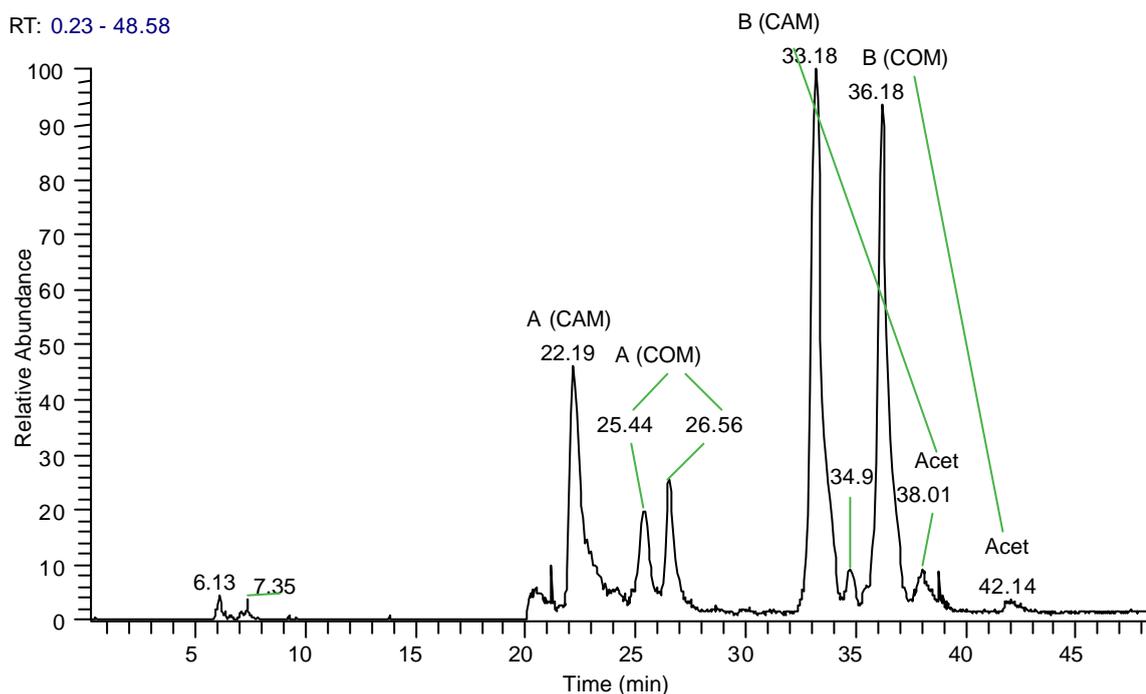


Abbildung 45: Totalionenstrom-Chromatogramm einer Mischung aus carbamidierten (CAM) und mit Iodessigsäure (COM) alkylierten A- und B-Ketten des Rinder-Insulins. RT = retention time.

Die mit Iodessigsäure (COM) derivatisierten Ketten eluieren nach den mit Iodacetamid (CAM) derivatisierten Ketten des Rinder-Insulins. Das Elutionsdiagramm zeigt den Total-Ionenstrom des Massendetektors. Demnach ist die Größe eines peaks ein Maß für die Ionisationsfähigkeit des Analyten. Die Probe enthält nach der reduktiven Kettenspaltung gleiche molare Mengen an A-Kette und B-Kette, so dass die vergrößerte Peakfläche für die B-Kette des Rinder-Insulins eine erhöhte Ionisationsfähigkeit der B-Kette gegenüber der A-Kette des Rinder-Insulins zeigt<sup>XII</sup>. Ein Einfluss der unterschiedlichen Alkylierung der Cysteine auf die Ionisationsfähigkeit wird nicht beobachtet. Für die A-Kette sind vier Cysteine mit dem jeweiligen Alkylierungsreagenz derivatisiert worden. Da sich die Masse von CAM ( $\Delta m = 57$ ) zu COM ( $\Delta m = 58$ ) um 1 Da unterscheidet, wird bei einem

<sup>XII</sup> Dies konnte auch bei MALDI-Spektren beobachtet werden (nicht gezeigt).

Ladungszustand von +2 eine um 2 Da höhere Quasi-Molekül-Ionenmasse detektiert (siehe Abbildung 46). Für die Fragment-Ionen ergeben sich je nach Ladungszustand und Ort der Fragmentierungen Erhöhungen der  $m/z$ -Werte von bis zu 4 Da. Die Fragment-Ionenspektren zeigen keine Unterschiede in den gebildeten Fragmentierungen (siehe Abbildung 46). Die drei intensivsten Fragmente ( $m/z$  1104,  $m/z$  1464 und  $m/z$  940) sind in allen Spektren gleich intensiv. Die unterschiedlichen Retentionszeiten der COM-Derivate können aus den Spektren nicht erklärt werden. Vermutlich handelt es sich um Isomere mit unterschiedlicher Retentionszeit. Die Massendifferenz kann durch die automatische Selektion der Vorläufer-Ionen und die Darstellung der Spektren im *stack*-Modus erklärt werden.

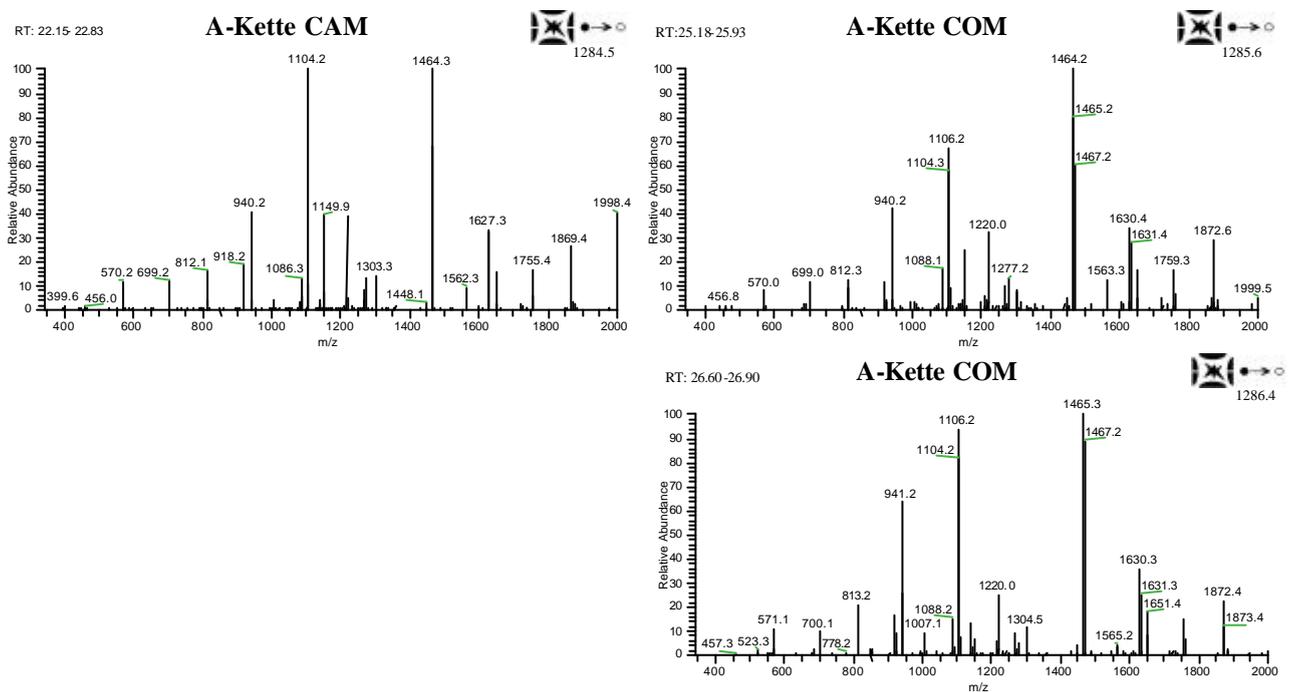


Abbildung 46: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektren der alkylierten A-Kette; Die Spektren sind über die Peakfläche des Totalionenstrom-Chromatogramms summiert worden. RT = Retentionszeiten. Die Masse des Vorläufer-Ions für das COM-Derivat ist um 2 Da erhöht, quod erat demonstrandum<sup>122</sup>.

Die B-Ketten Derivate haben eine größere Elutionszeit. Der Massenunterschied zwischen CAM- und COM-Derivat bei zwei derivatisierten Cysteinen beträgt für  $[M+3H]^{3+}$  0.66 Da.

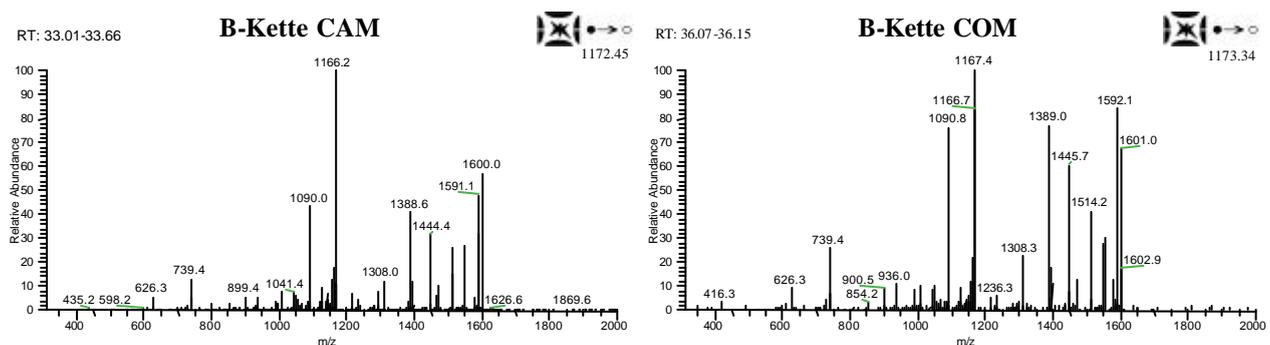


Abbildung 47: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektren der reaktiv alkylierten B-Kette des Rinder-Insulins (CAM/COM).

Der Vergleich der Spektren (siehe Abbildung 47) der B-Kette des Rinder-Insulins zeigt, dass die Fragmentierungen in etwa gleichmäßig auftreten. Die Fragment-Ionen 1600/1601 zusammen mit 1591/1592 zeigen die Erhöhung der Masse der Fragment-Ionen durch die COM-Derivatisierung. Es handelt sich um ein zweifach geladenes Ion ( $b_{27}^{2+}$ ) und den Neutralverlust von Wasser ( $b_{27}^{2+}-H_2O$ ). Die geringfügig erhöhte Intensität des COM-Derivates kann nicht strukturell erklärt werden, da die relativen Verhältnisse der Fragment-Ionen keine charakteristische Veränderung zeigen.

Für alle weiteren Experimente wird Iodacetamid verwendet, weil es zum einen keine Säurefunktion enthält und zum anderen die Residuenmasse des derivatisierten Cysteins (Cys CAM = 160) besser von Tyrosin (163) unterscheiden lässt.

### 5.3 A-Kette des Rinder-Insulins

Für die Derivatisierungsreaktionen wird die A-Kette des Rinder-Insulins verwendet, da dieses Peptid mit 21 Aminosäuren (GIVEQCCASV<sup>10</sup>CSLYQLENY<sup>20</sup>N) fast doppelt so groß ist wie das Angiotensin I. Die Sequenz enthält kein Prolin, weshalb keine intensiven Fragmentierungen aufgrund struktureller Gegebenheiten in der Sequenz erwartet werden können (Prolineffekt). Für die Derivatisierung basischer Zentren steht nur der N-Terminus zur Verfügung, weshalb nicht mit Stellungsisomeren gerechnet werden muss.

#### 5.3.1 A-Kette des Rinder-Insulins, carbamidiert

Die A-Kette des Rinder-Insulins ist ein 21 Aminosäure langes Peptid. Es besitzt vier Cysteine, die aufgrund ihrer Thiol-Funktion zu unerwünschten Nebenreaktionen bei Derivatisierungsreaktionen an basischen Zentren führen. Deshalb wird die carbamidierte Form (Inaktivierung der Cysteine) aus der Spaltung des Rinder-Insulins verwendet. Das

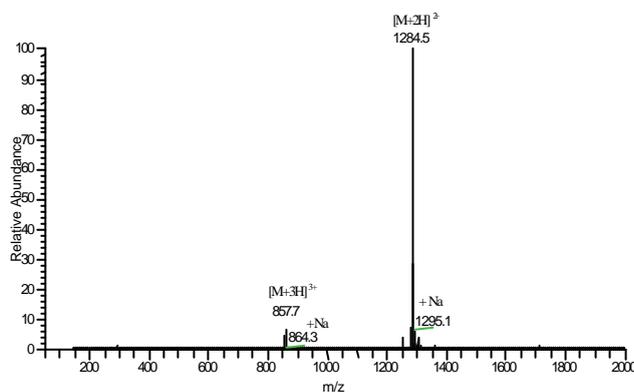


Abbildung 48: ESI-MS-Spektrum der carbamidierten A-Kette. Es sind keine Nebenreaktionen aufgetreten.

Molekulargewicht beträgt 2566 Da. Im MS-Spektrum entstehen die Ladungszustände +2 und +3 ( $m/z$  1284,8 und  $m/z$  857). Der maximale Ladungszustand +3 auf einem Peptid mit 21 Aminosäuren, von denen nur der N-Terminus ein

basisches Zentrum ist<sup>XIII</sup>, zeigt dass der maximale Protonierungsgrad, nicht durch die Anzahl der basischen Aminosäuren bestimmt ist, sondern auch von der Größe des Molekül-Ions beeinflusst wird.

### 5.3.1.1 Fragmentierung des Molekül-Ions $[M+2H]^{2+}$ der carbamidierten A-Kette

Im Spektrum der zweifach geladenen carbamidierten A-Kette entstehen hauptsächlich einfach geladene Fragment-Ionenserien (siehe Abbildung 49). Doppelt geladene Fragmente finden sich nur für  $y_{18}^{2+}$  und  $y_{17}^{2+}$ . Letzteres wird noch durch den Wasserverlust des einfach geladenen  $y_8^+$ - oder des  $b_{10}^+$ -Fragment-Ions überlagert, so dass die Existenz nicht eindeutig belegbar ist.

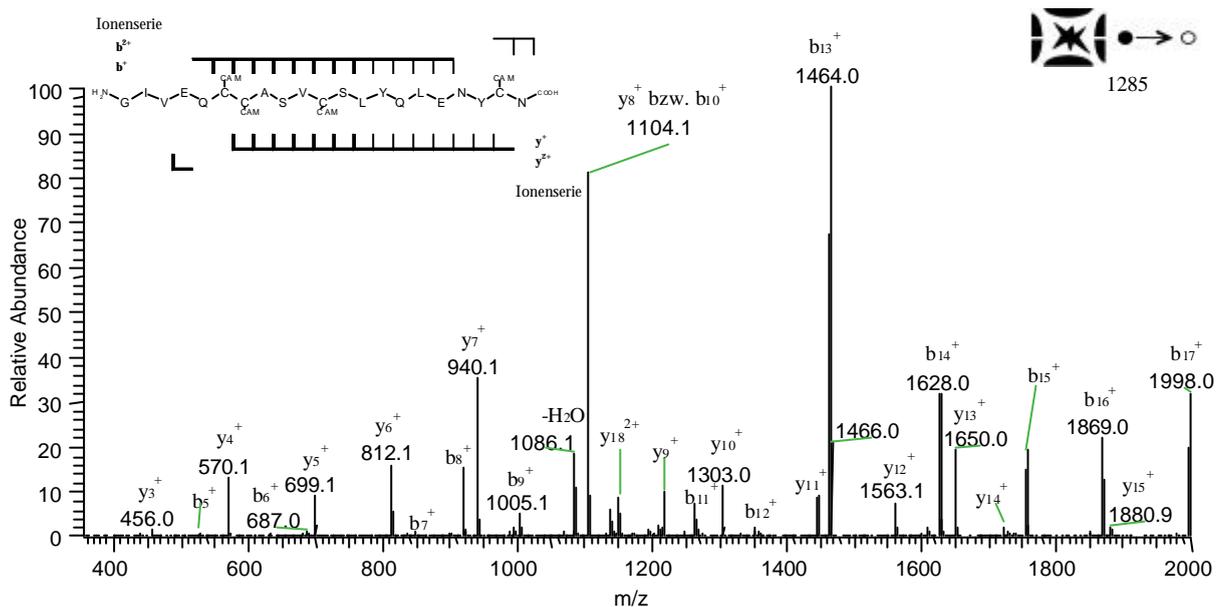


Abbildung 49: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum der carbamidierten A-Kette  $[M+2H]^{2+}$  des Rinder-Insulins.

Die b-Ionenserie ist bei Massen größer 1100 m/z dominant, die y-Ionenserie darunter. Bei m/z 1104.2 überlagern sich die Fragment-Ionen  $b_{10}^+$  und  $y_8^+$ . Nach Bindungsbruch in der Peptidkette verteilen sich die beiden Ladungen in etwa gleichmäßig auf die Peptidfragmente. Die unterschiedlichen Intensitäten innerhalb der Fragment-Ionenserien sind korreliert, d. h. die korrespondierenden Fragment-Ionen sind in etwa gleich intensiv (m/z 940 [ $y_7^+$ ] und 1628 [ $b_{14}^+$ ], 812 [ $y_6^+$ ] und 1756 [ $b_{15}^+$ ], 699 [ $y_5^+$ ] und 1869 [ $b_{16}^+$ ]). Für andere Ionenpaare ist dies nicht eindeutig zu bestimmen, da sich in m/z 1104 [ $y_8^+$  und  $b_{10}^+$ ] und m/z 1464 [ $y_{11}^+$  und  $b_{13}^+$ ] die Intensitäten von je zwei Ionen überlagern.

<sup>XIII</sup> Zum Vergleich: Die B-Kette des Rinder-Insulins besteht aus 30 Aminosäuren (max. Ladungszustand: +5). Gleichzeitig befinden sich in der Sequenz auch fünf basische Zentren (N-Terminus, 2 His, Arg und Lys)!

### 5.3.1.2 Fragmentierung des Molekül-Ions $[M+3H]^{3+}$ der carbamidierten A-Kette

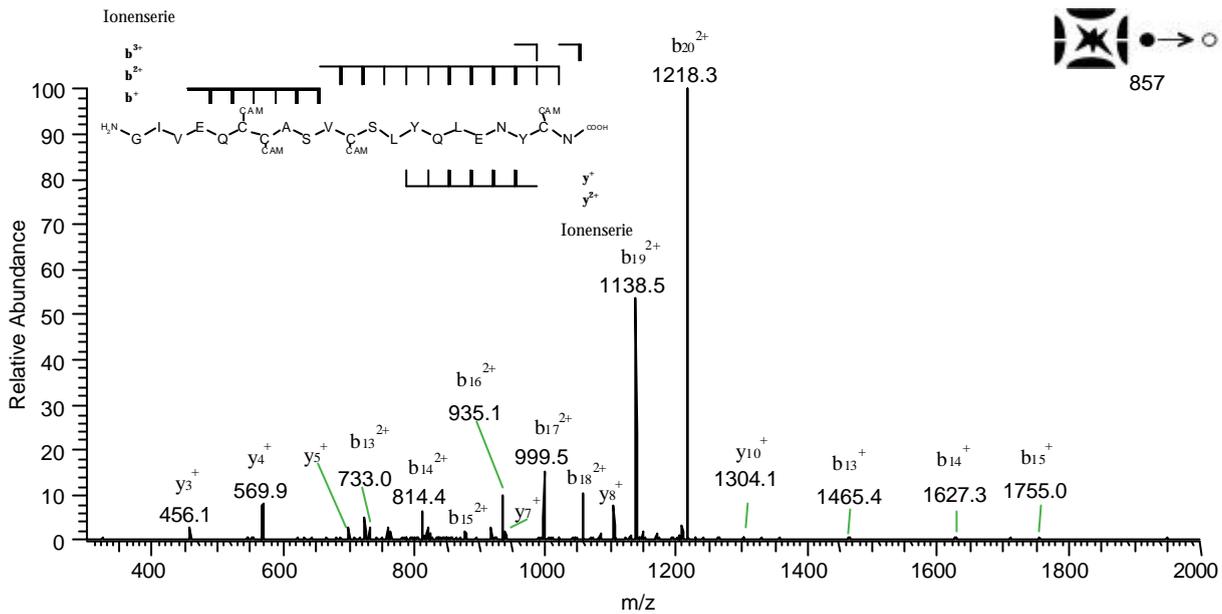


Abbildung 50: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum der carbamidierten A-Kette  $[M+3H]^{3+}$  des Rinder-Insulins.

Als intensivste Fragment-Ionenserie tritt die n-fach geladene b-Ionenserie (b<sub>20</sub><sup>2+</sup> bis b<sub>10</sub><sup>2+</sup>) auf. Die Serie wird im einfachen Ladungszustand fortgeführt (b<sub>15</sub><sup>+</sup> bis b<sub>4</sub><sup>+</sup>). Die Intensitäten der Ionen sind allerdings schwach. Deutlich intensiver treten Ionen der einfach geladenen y-Ionenserie (y<sub>8</sub><sup>+</sup> bis y<sub>3</sub><sup>+</sup>) auf. Sie sind aus dem dreifach geladenen Vorläufer-Ion durch Ladungstrennung entstanden. Bindungsbrüche im N-terminalen Bereich führen nur zu einfach geladenen b-Fragmenten, deren korrespondierenden y-Fragmente nicht detektiert werden. Dadurch ist eine Identifizierung des N-Terminus nicht möglich.

Das Fehlen basischer Aminosäuren führt zu einem gleichmäßigen Fragmentierungsverhalten (Ladungszustand 2). Die mobilen Protonen können sich ungehindert über das Peptidrückgrat verteilen und stehen für Fragmentierungsreaktionen zur Verfügung. Durch die dritte Ladung ändert sich das Bild der Fragmentierung. Bevorzugt entstehen nun die b-Fragment-Ionen (im zweifachen Ladungszustand) sowie die korrespondierenden „kleinen“ y-Fragment-Ionen. Hier ist von einer bevorzugten Protonierung des N-Terminus auszugehen.

### 5.3.2 Acetylierung der carbamidierten A-Kette des Rinder-Insulins

Durch die Acetylierung des N-Terminus wird dessen Basizität herabgesetzt, wodurch das Fragmentierungsverhalten des Peptids beeinflusst werden soll. Das Spektrum zeigt als Hauptprodukt eine einfache Acetylierung des Peptids. Als Verunreinigungen können noch Na-Addukt-Ionen detektiert werden.

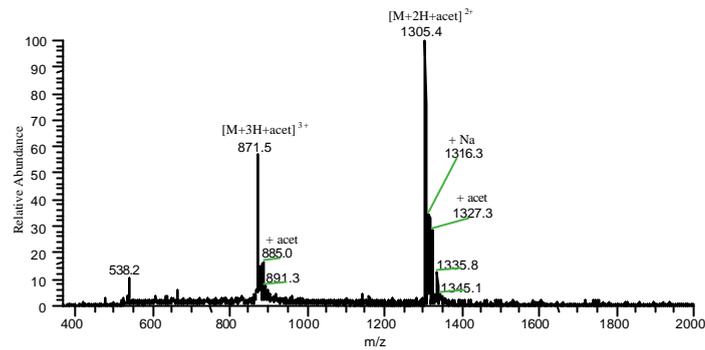


Abbildung 51: MS-Spektrum des Derivatisierungsansatzes (Mono-Acetylierung).

Für den zweifachen Ladungszustand wird eine Bis-Acetylierung (m/z 1327.4) detektiert, die vermutlich durch O-Acetylierung an Serin (vorhanden in Position 9 und 12) entstanden ist. Diese Ionenspezies wurde nicht weiter untersucht.

#### 5.3.2.1 Fragmentierung der acetylierten A-Kette [M+2H]<sup>2+</sup> des Rinder-Insulins

Das Fragment-Ionenspektrum der acetylierten A-Kette zeigt im zweifachen Ladungszustand eine kurze Serie von *ipso*-Fragmenten ( $b_{21}^{2+}$  bis  $b_{17}^{2+}$ ), die sodann in den einfachen Ladungszustand übergeht ( $b_{16}^+$  bis  $b_{13}^+$ ).

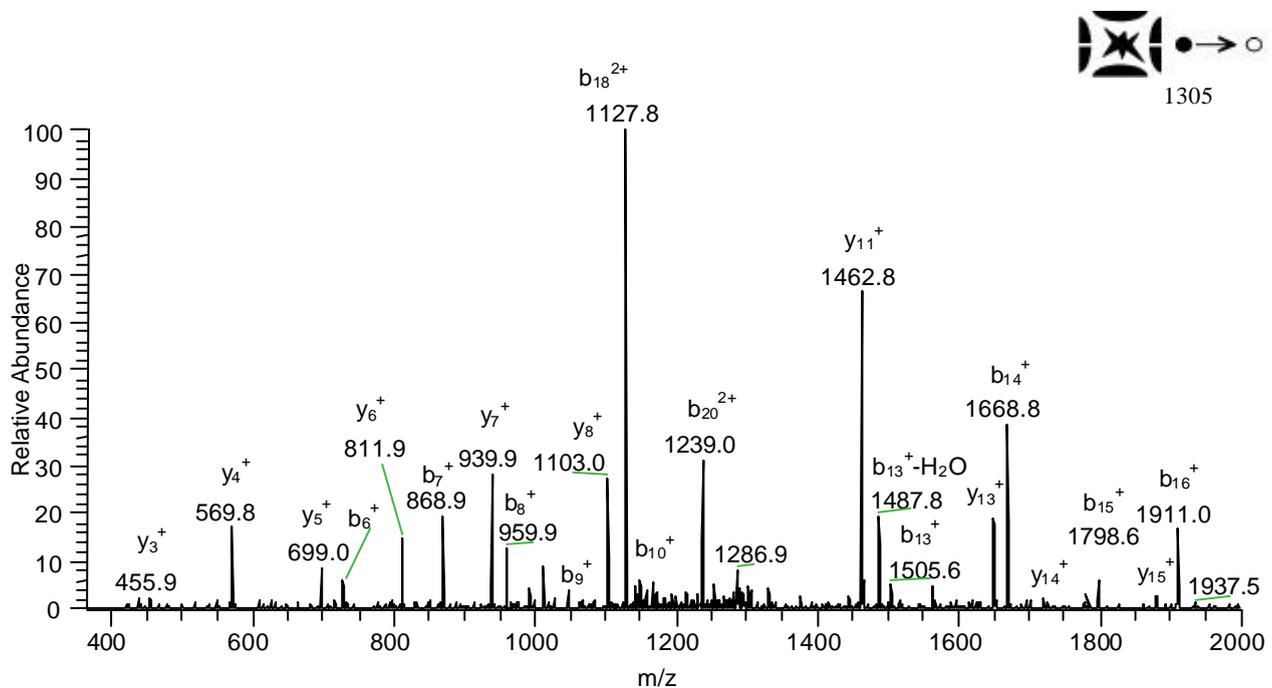


Abbildung 52: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum der acetylierten A-Kette [M+2H]<sup>2+</sup>.

Als y-Fragment-Ionen lassen sich mit geringer Intensität einige zweifach geladene Fragmente detektieren. Deutlich intensivere Fragmente sind einfach geladene y-Fragmente, die durch *charge-separation* Mechanismen aus dem C-terminalen Bereich des Peptids entstanden sind. Die Fragmentierung gegenüber dem nativen Peptid ist etwas gleichmäßiger geworden, ohne jedoch eine deutlich erweiterte Sequenzabdeckung zu ergeben.

### 5.3.2.2 Fragmentierung der acetylierten A-Kette $[M+3H]^{3+}$ des Rinder-Insulins

Das Spektrum zeigt als Basispeak das zweifach geladene  $b_{20}^{2+}$ -Fragment-Ion, welches schon im underivatisierten Peptid auftrat.

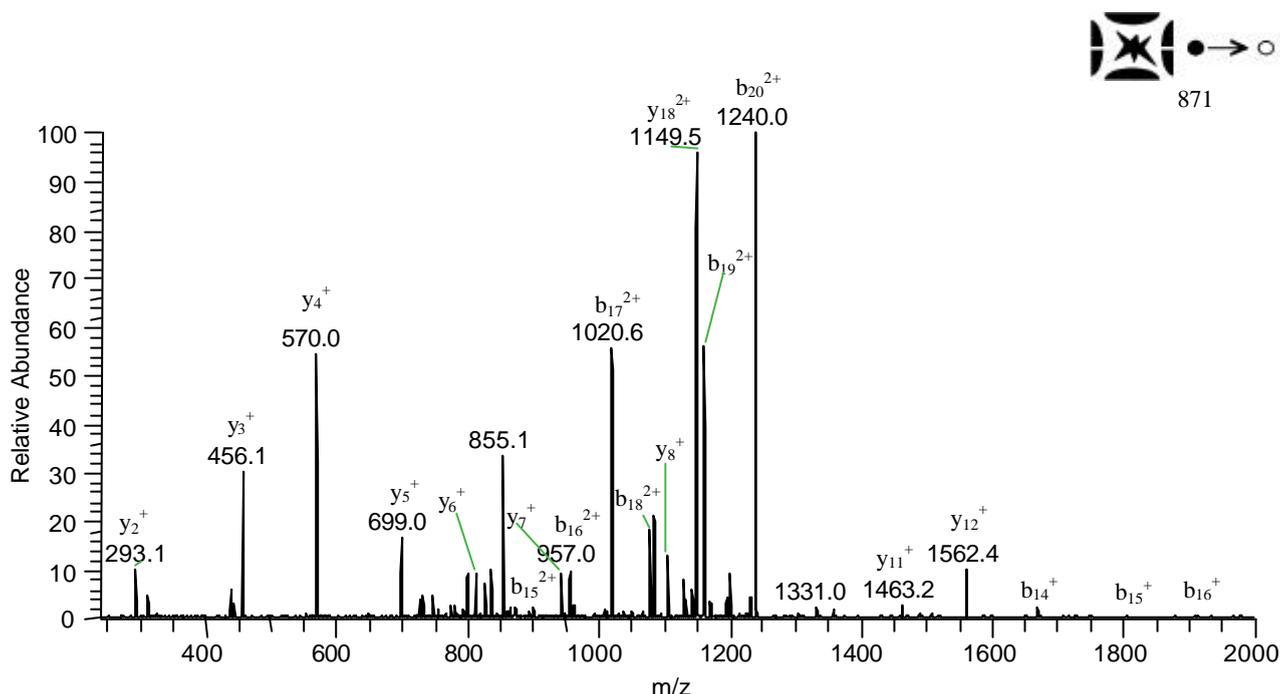


Abbildung 53: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum der acetylierten A-Kette  $[M+3H]^{3+}$ .

Die zweifach geladene b-Fragment-Ionenserie ( $b_{20}^{2+}$  bis  $b_{15}^{2+}$ ) stellt die intensivste Fragmentierung dar, die durch die korrespondierenden einfach geladenen y-Fragment-Ionen bestätigt werden. Einige b-Fragmente im dreifachen Ladungszustand sind zu detektieren.

Es bildet sich ein intensives  $y_{18}^{2+}$ -Fragment-Ion, dessen relative Intensität gegenüber dem underivatisierten Peptid um das 10fache erhöht ist. Eine Vermutung ist, dass sich im underivatisierten Peptid eine stabilisierende Salzbrücke (siehe Abbildung 54 links) zwischen dem Glutamat und dem N-Terminus ausbildet, die nach der Acetylierung nicht mehr ausgebildet wird.

Zum anderen könnte durch die Acetylierung der N-Terminus nicht mehr der bevorzugte Ladungsträger sein. Dadurch wird das mobile Proton auf dem N-terminalen Bereich des Peptidrückgrats verschoben und kann den Bindungsbruch induzieren (*charge-site-induced* Mechanismus). Es stellt sich aber die Frage, warum ausschließlich  $y_{18}^{2+}$  intensiv fragmentiert. Ein

mobiles Proton sollte auch die Bildung der benachbarten zweifach geladenen  $\gamma$ -Fragmente ermöglichen. Ähnlich dem Aspartat könnte bei der Fragmentierung hier das Glutamat durch eine Protonen-Übertragung auf das Peptid-Rückgrat (siehe gestrichelter Pfeil Abbildung 54) an dem Bindungsbruch beteiligt sein. Der Unterschied liegt darin, dass hier N-terminal zum Glutamat der Bindungsbruch in der Peptidkette erfolgt (schwarzer Pfeil).

Dieser Befund lässt sich durch den Vergleich der Fragmentierungsintensitäten (Abbildung 55) belegen.

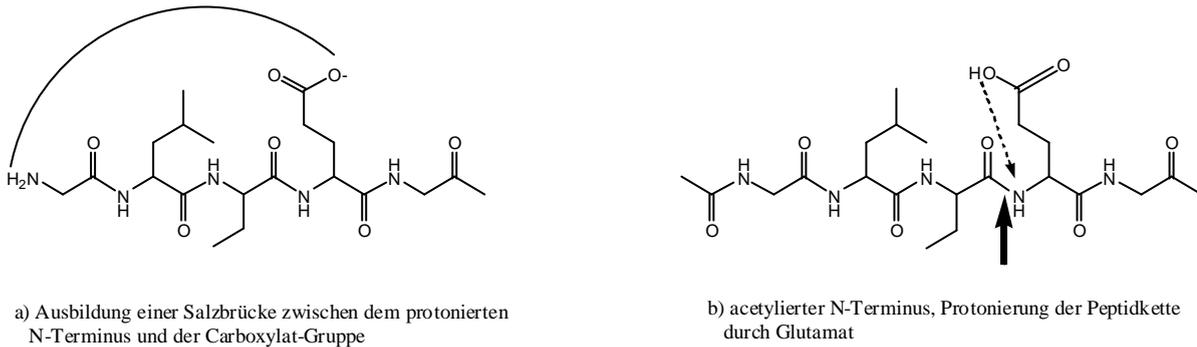


Abbildung 54: Die N-terminale Aminosäuresequenz der A-Kette des Rinder-Insulins; a) underivatisiert = freier N-Terminus b) Acetylierung des N-Terminus, Der schwarze Pfeil zeigt den Bindungsbruch Val-Glu, Der gestrichelte Pfeil die Protonenübertragung durch die Carboxylat-Gruppe.

### 5.3.3 Einfluss der Acetylierung auf das Fragmentierungsverhalten der A-Kette des Rinder-Insulins

Durch die Acetylierung hat sich die gleichmäßige Bildung von intensiven Fragment-Ionen aus dem Ladungszustand 2+ etwas verschlechtert. Es sind b-Fragment-Ionen nur noch mit geringerer Intensität detektierbar, die durch Bindungsbruch in der Mitte des Peptids entstanden sind (siehe Abbildung 55, rechts oben). Auf die Fragmentierungen am C-Terminus hat die Acetylierung keine großen Auswirkungen.

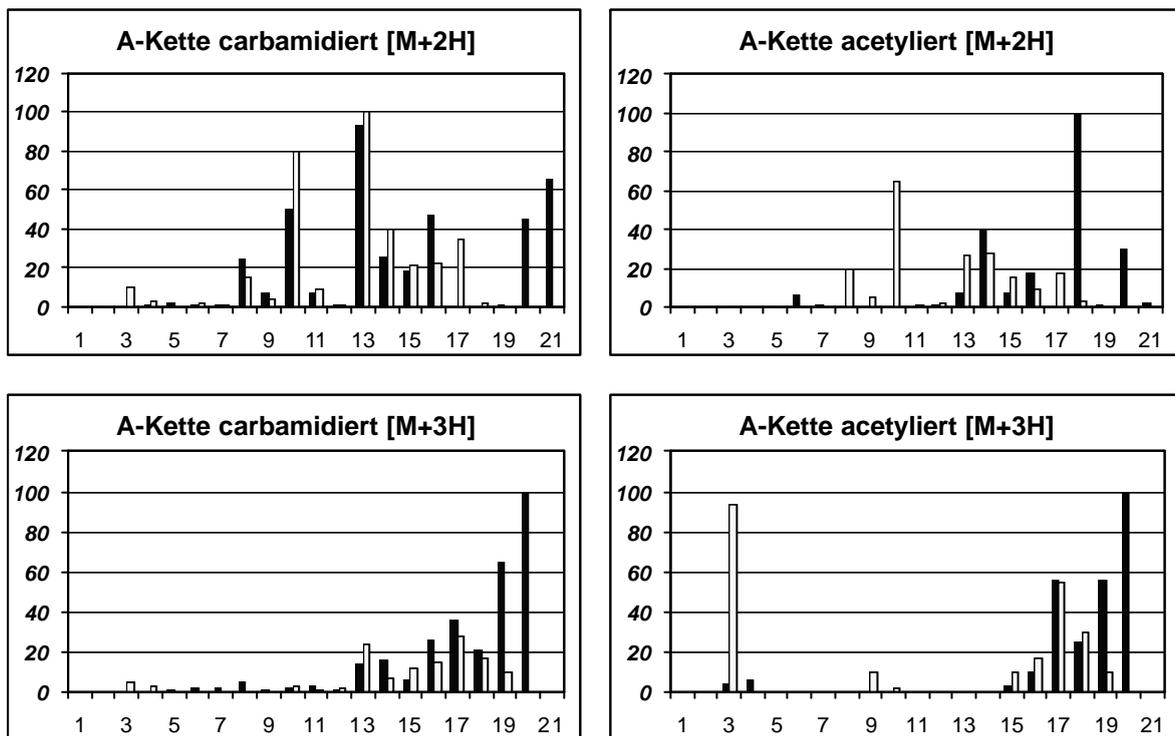


Abbildung 55: Ionen-Intensitäten der Fragmente der carbamidierten A-Kette und der acetylierten A-Kette; Dunkle Balken sind die Intensitäten der b-Fragment-Ionen, helle Balken repräsentieren die Intensitäten der y-Fragmente.

Durch die Erhöhung der Ladungsdichte (Ladungszustand +3) bilden sich sowohl im underivatierten als auch im acetylierten Peptid die Hauptfragmentierungen nicht mehr in der Mitte des Peptids. Statt dessen entstehen vorwiegend zweifach geladene b-Fragment-Ionen (schwarze Balken), die durch Bindungsbrüche im C-terminalen Bereich entstanden sind. Durch Ladungstrennung entsteht die korrespondierende Serie einfach geladener y-Fragmente (helle Balken in Abbildung 55, untere Reihe). Als zweifach geladenes y-Fragment entsteht ausschließlich das  $y_{18}^{2+}$ -Fragment des acetylierten Peptids. Die Ursache für die intensive Fragmentierung ist der modifizierte N-Terminus, der die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen der Aminofunktion des N-Terminus und dem Glutamat (Pos 3) verhindert (siehe Abbildung 54).

### 5.3.4 Derivatisierung der A-Kette des Rinder-Insulins mit (Bromo-ethyl)-triphenylphosphin

Für die Derivatisierung der A-Kette des Rinder-Insulins mit Br-TPP wird ein Mono-Addukt erwartet, da neben dem reaktiven N-Terminus keine zusätzlichen basischen Zentren vorhanden sind. Als Ladungszustände werden zwei und dreifach geladenen Vorläufer-Ionen erwartet, da diese auch im underivatisierten Zustand auftreten. Durch die feste Ladung im Phosphoniumaddukt könnte eine weitere Ladung eingeführt werden, wenn das Peptid groß genug ist vier Ladungen zu tragen.

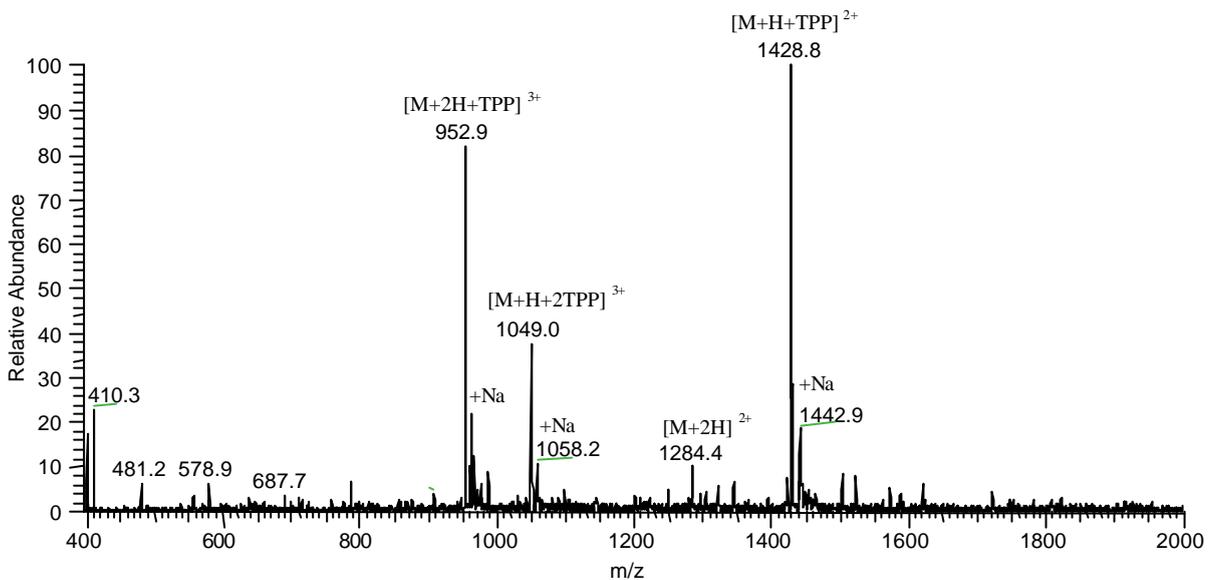


Abbildung 56: ESI-MS-Spektrum der carbamidierten A-Kette nach Derivatisierung mit Br-TPP. Als Hauptprodukt ist eine einfache Derivatbildung ( $m/z$  952.9 und  $m/z$  1428.8) zu finden. Die Bezeichnung der Molekül-Ionen geht von der carbamidierten B-Kette aus. Da TPP eine fixierte positive Ladung trägt ergibt sich der Ladungszustand aus der Summe der Protonen und der Anzahl der TPP Derivate.

Neben einigen Verunreinigungen (Na-Addukt-Ionen) lassen sich die Ladungszustände +2 ( $m/z$  952.9) und +3 ( $m/z$  1428.8) detektieren, die im ESI-MS<sup>2</sup>-Experiment charakterisiert werden sollen. Das Ion  $m/z$  1049 zeigt eine zweifache Derivatisierung der carbamidierten A-Kette des Rinder-Insulins. Es handelt sich um ein Nebenprodukt.

#### 5.3.4.1 Fragmentierung des Molekül-Ions $[M+H]^{2+}$ des Mono-TPP-Derivats der A-Kette des Rinder-Insulins

Der Basispeak im Fragment-Ionenspektrum des zweifach geladenen Molekül-Ions des Mono-TPP-Derivats ist  $b_{19}^{2+}$ . Das Spektrum weist intensive  $b^{2+}$ -Fragment-Ionen ( $b_{15}^{2+} - b_{21}^{2+}$ ) auf. Bedingt durch die Größe der Fragment-Ionen ist  $b_{14}^+$  als erstes einfach geladenes Ion ( $m/z$  1915) detektierbar. Die einfach geladene Ionenserie setzt sich bis  $b_3^+$  fort ( $b_{12}$ ,  $b_9$  und  $b_5$  sind nicht vorhanden). Die beiden ersten Lücken in der Ionenserie haben jeweils ein Serin an der N-terminalen



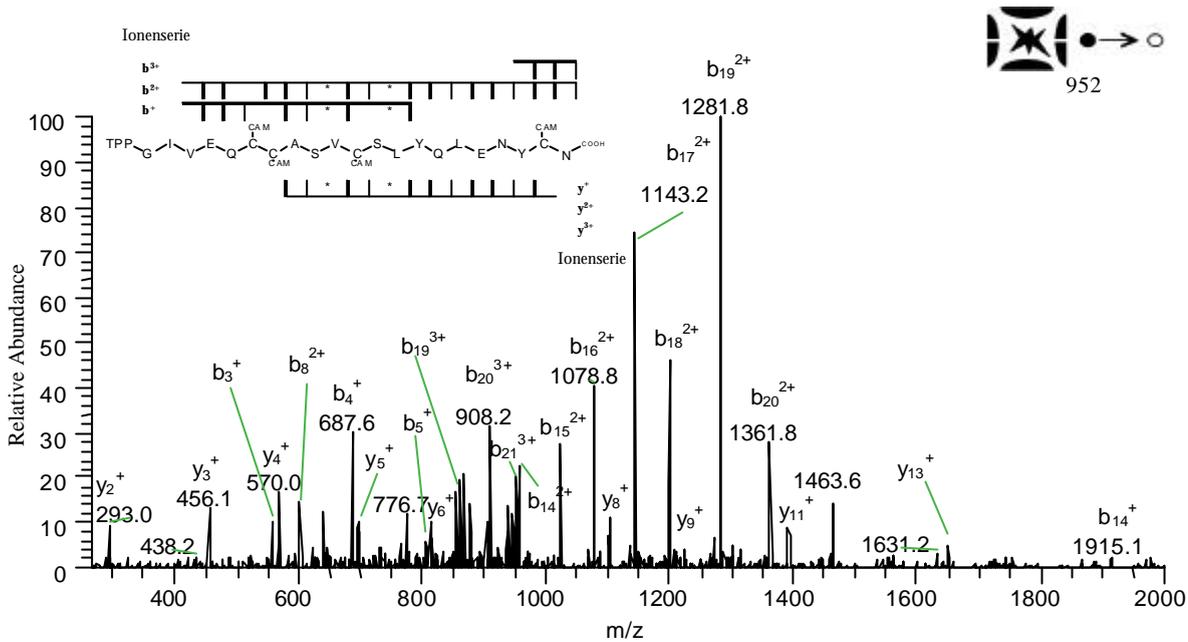


Abbildung 58: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Mono-TPP-Derivats der A-Kette  $[M+2H]^{3+}$ . Die mit \* markierten Fragment-Ionen (bzw. Peptidbindungen) sind solche, die im Spektrum nicht detektiert werden können. Sie sind durch eine Ser-Xxx Bindung charakterisiert.

Die *ipso* b-Fragment-Ionenserie ( $b_{21}^{3+}$  bis  $b_{19}^{3+}$ ) charakterisiert den C-Terminus. Die zweifach geladene  $b^{2+}$ -Fragment-Ionenserie beginnt mit  $b_{20}^{2+}$  und führt so die C-terminale Sequenz weiter fort. Bis zum  $b_{13}^{2+}$ -Fragment sind die Ionen intensiv und gäben im Falle einer „de novo“-Sequenzierung die Sequenzinformation über die acht C-terminalen Aminosäuren der A-Kette. Die Serie der doppelt geladenen b-Fragment-Ionen setzt sich bis  $b_8^{2+}$  ( $m/z$  603.7) fort. Einzig die Fragmente neben den beiden Serinen fehlen ( $b_9^{2+}$  und  $b_{12}^{2+}$ ). Übereinstimmend mit den beobachteten Fragmenten aus dem zweifach geladenen Vorläufer-Ion (siehe 5.3.4.1) fehlt in der y-Fragment-Ionenserie das  $y_9^+$ -Fragment und das  $y_{11}^+$ -Fragment.

Zweifach oder dreifach geladene y-Fragment-Ionen werden nicht beobachtet. Lediglich die einfach geladenen y-Fragment-Ionenserien ( $y_{14}^+$  bis  $y_2^+$ ) sind bis auf die erwähnten fehlenden Fragmente neben Serin zu detektieren.

Die Erklärung für die fehlenden Fragmente C-terminal zu Serin könnte in einer bevorzugten Fragmentierung der N-terminalen Serin Bindung liegen.

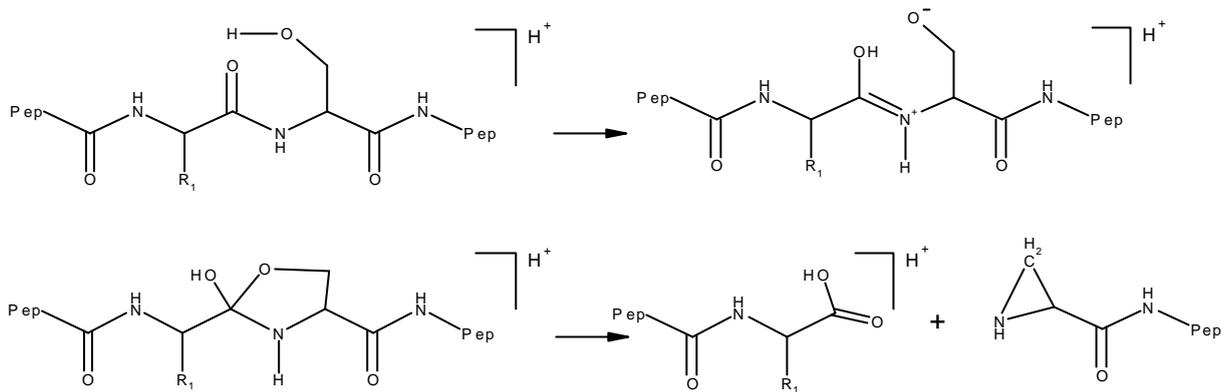


Abbildung 59: Möglicher Fragmentierungsmechanismus für den bevorzugten Bindungsbruch auf der N-terminalen Seite von Serin.

Für Bradykinin (RPPGFSPFR) wurde ein solcher Mechanismus vorgeschlagen<sup>123</sup>, bei dem Serin in seiner deprotonierten Form die Fragment-Ionenbildung durch einen Bindungsbruch der Peptidkette fördert. Allerdings entstehen hier zunächst b-Fragment-Ionen, die ein zusätzliches Wassermolekül besitzen (siehe Abbildung 59). Durch Aminosäureaustausch<sup>123</sup> (Ser wird gegen Ala ausgetauscht) konnte gezeigt werden, dass diese Fragment-Ionenbildung nicht mehr stattfindet.

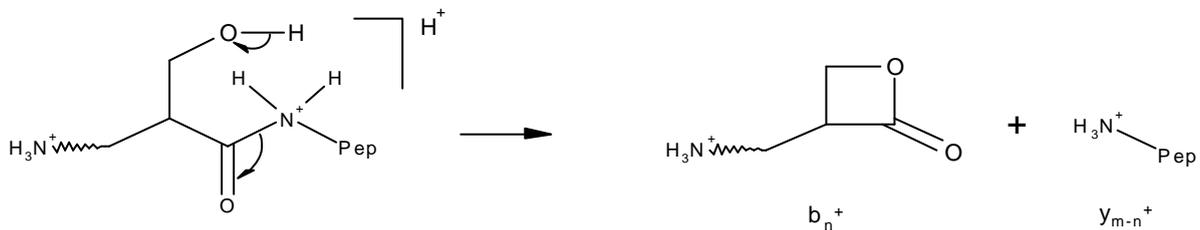


Abbildung 60: Fragment-Ionenbildung C-terminal zum Serin nach BIEMANN; Es handelt sich um einen charge-site-initiated Mechanismus, bei dem ein Proton aus der Seitenkette des Serins auf das  $\gamma$ -Fragment übertragen wird. Das zweite Proton ist demnach am N-Terminus lokalisiert und nicht am Fragmentierungsmechanismus beteiligt.

Es zeigt sich, dass dem Serin eine besondere Rolle bei Fragmentierungsreaktionen zukommt. Warum Fragmentierungen auf der C-terminalen Seite des Serins ausbleiben, erklärt dieses Modell nur insofern, als dass es für die N-terminale Seite des Serins einen plausiblen Reaktions-Mechanismus vorschlägt. Dies ist insofern bemerkenswert, da von Biemann<sup>124</sup> ein Fragmentierungsmechanismus vorgeschlagen wird (siehe Abbildung 60), bei dem die C-terminale Peptidbindung einer bevorzugten Fragmentierung durch das Serin unterliegt.

### 5.3.5 Einfluss der Alkylierung mit Br-TPP auf die Spektren der A-Kette des Rinder-Insulins

Um die Fragmentierungen innerhalb der Ketten besser vergleichen zu können, werden die Intensitäten der einzelnen Fragmente unabhängig von ihrem Ladungszustand addiert. Dadurch kann es zu relativen Intensitäten >100 kommen (siehe Abbildung 61, rechts unten). Das Ion  $b_{19}$  des Mono-Derivats der A-Kette kommt z. B. in den Ladungszuständen +2 und +3 vor.

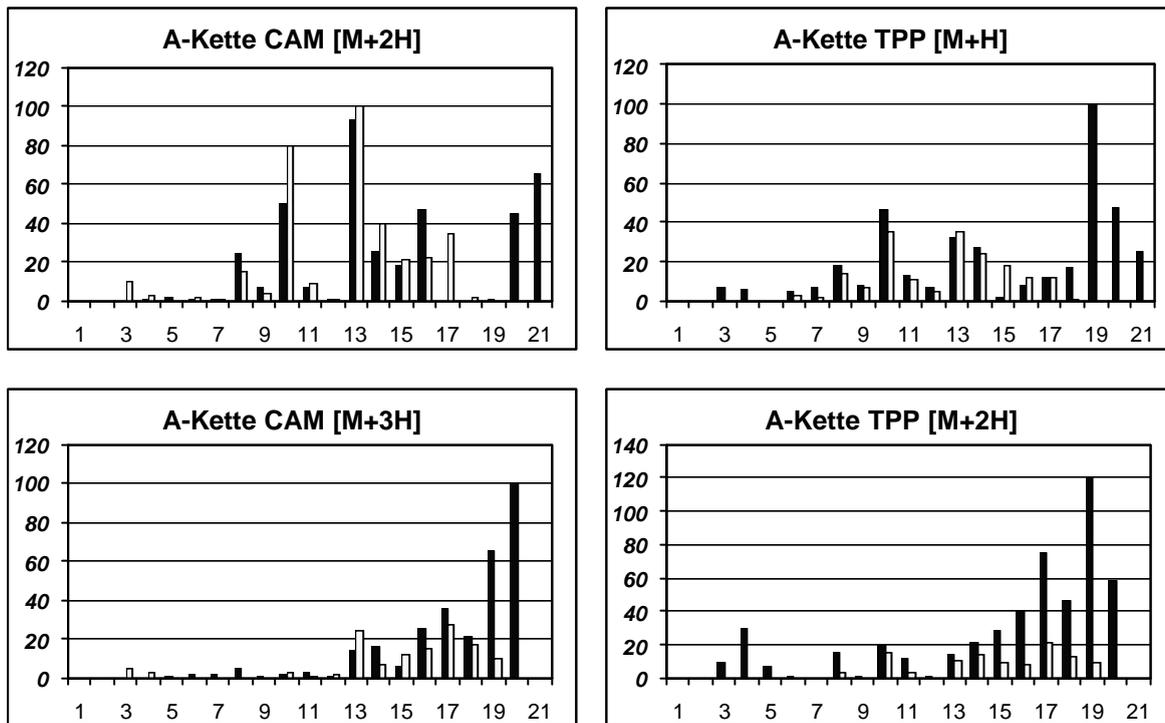


Abbildung 61: Intensitätsverteilung der Fragmentierungen der A-Kette des Rinder-Insulins; hell y-Fragmente, dunkel b-Fragmente. TPP trägt eine eigene Ladung, wodurch ein Proton weniger auf dem Peptid vorhanden ist, als es der Gesamtladungszustand angibt.

Durch die Einführung einer positiven fixierten Ladung am N-Terminus haben sich die Intensitäten der Fragment-Ionenspektren teilweise verbessert. Im N-terminalen Bereich entstanden einige kleine b-Fragment-Ionen. Dafür sind die korrespondierenden mehrfach geladenen y-Fragmente nicht mehr zu detektieren. Durch die Derivatisierung ist eine feste Ladung auf den N-Terminus gezogen worden, so dass beim Bindungsbruch die Ladung bevorzugt auf dem b-Fragment-Ion lokalisiert bzw. stabilisiert ist.

Im Ladungszustand +3 haben sich die Intensitäten in der Mitte des Peptids verbessert (siehe Abbildung 61 rechts unten). Bevorzugt sind dabei b-Fragment-Ionen (durchgehend höhere Intensitäten als die korrespondierenden y-Fragmente) entstanden. Das intensivste b-Fragment ist jetzt  $b_{19}^{2+}$  gegenüber  $b_{20}^{2+}$  bei der underivatisierten A-Kette des Rinder-Insulins.

Im zweifachen Ladungszustand sind ähnliche Effekte zu beobachten. Durch die Derivatisierung ist auch hier eine intensivere b-Fragment-Ionenbildung zu beobachten. Die y-Fragmente sind in ihrer

Entstehung unterdrückt worden. Im underivatisierten Peptid ist das  $y_3^+$ -Fragment der Basispeak, nach Derivatisierung das  $b_9^{2+}$ -Fragment. Insgesamt sind die meisten Fragmentierungen nun am C-Terminus zu finden, wobei ein paar wenige einfach geladene b-Fragment-Ionen entstanden sind, die den N-Terminus charakterisieren.

## 5.4 B-Kette des Rinder-Insulins

Das 30 Aminosäuren lange Peptid (Mol.-Gew. 3512.66, nach Alkylierung mit Iodacetamid) besitzt in der Sequenz (FVNQHLCGSH<sup>10</sup>LVEALYLVCG<sup>20</sup>ERGFFYTPKA) mit Lys an Position 29 ein zweites reaktives basisches Zentrum. Der N-Terminus, zwei Histidine, ein Arginin und Lysin lassen als maximalen Protonierungsgrad eine fünffache Protonierung des Peptids vermuten.

### 5.4.1 Carbamidierung der B-Kette des Rinder-Insulins

Im MS<sup>1</sup>-Spektrum sind die Ladungszustände  $[M+2H]^{2+}$ ,  $[M+3H]^{3+}$ ,  $[M+4H]^{4+}$  und  $[M+5H]^{5+}$  zu detektieren. Der Einfluss der Ladungszustände auf das Fragmentierungsverhalten der B-Kette soll in ESI-MS<sup>2</sup>-Experimenten untersucht werden.

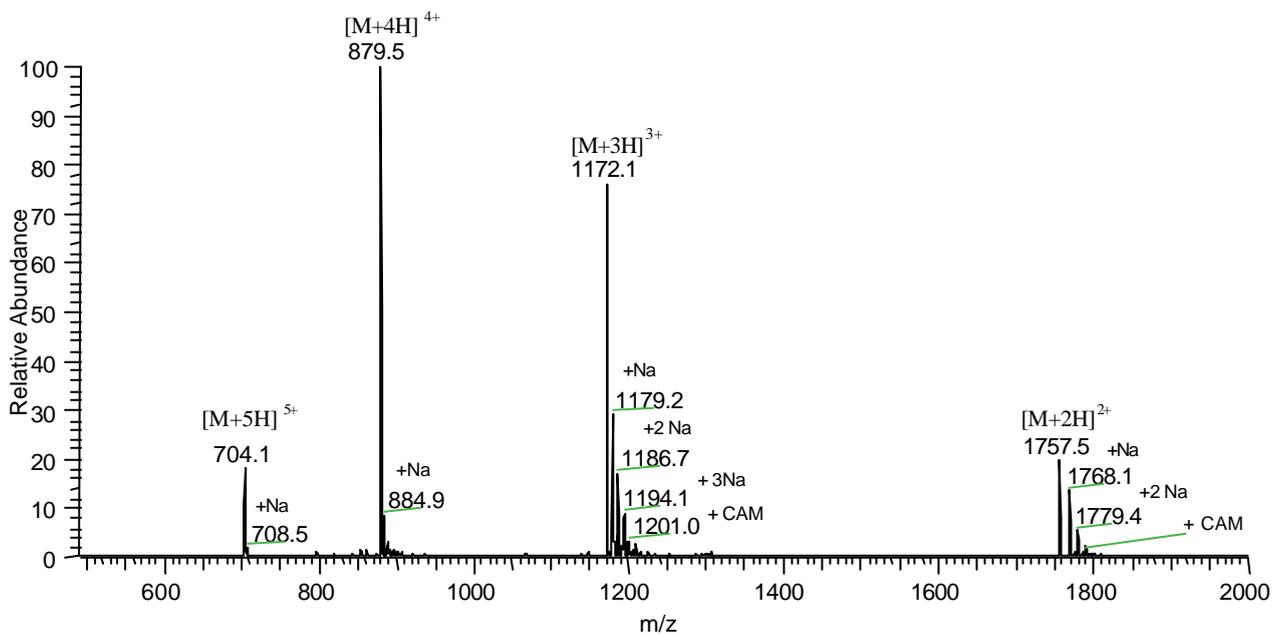


Abbildung 62: ESI-MS-Spektrum der carbamidierten B-Kette des Rinder-Insulins.

Neben Natrium-Addukt-Ionen lassen sich für die Ladungszustände +2 und +3 Überalkylierungen als Nebenprodukte detektieren. Die höher geladenen Molekül-Ionen  $[M+4H]^{4+}$ , und  $[M+5H]^{5+}$  weisen die Anlagerung eines Natrium-Kations auf. Für die weiteren Experimente sind die gebildeten Addukt-Ionen ohne Einfluss.

### 5.4.1.1 Fragmentierung des Molekül-Ions $[M+2H]^{2+}$ der carbamidierten B-Kette

Der Basispeak ( $m/z$  1712.1) ist das zweifach geladene  $b_{29}^{2+}$ -Fragment-Ion. Die *ipso*-Ionenserie ( $b_{30}^{2+}$  bis  $b_{25}^{2+}$ ) gibt Sequenzinformationen über den C-Terminus. Das Ion  $b_{27}^{2+}$  ist dabei nicht so dominant wie es aufgrund des Prolin-Effektes (Bindungsbruch Thr-Pro) erwartet werden könnte. Die Dominanz dieses Ions zeigt sich im Spektrum der dreifach geladenen B-Kette (siehe 5.4.1.2). Fortgesetzt wird die Serie der b-Ionen durch einfach geladene Fragment-Ionen ( $b_{17}^+$  bis  $b_5^+$ ), die in ihrer Intensität zu kleineren Fragmenten hin abnehmen.

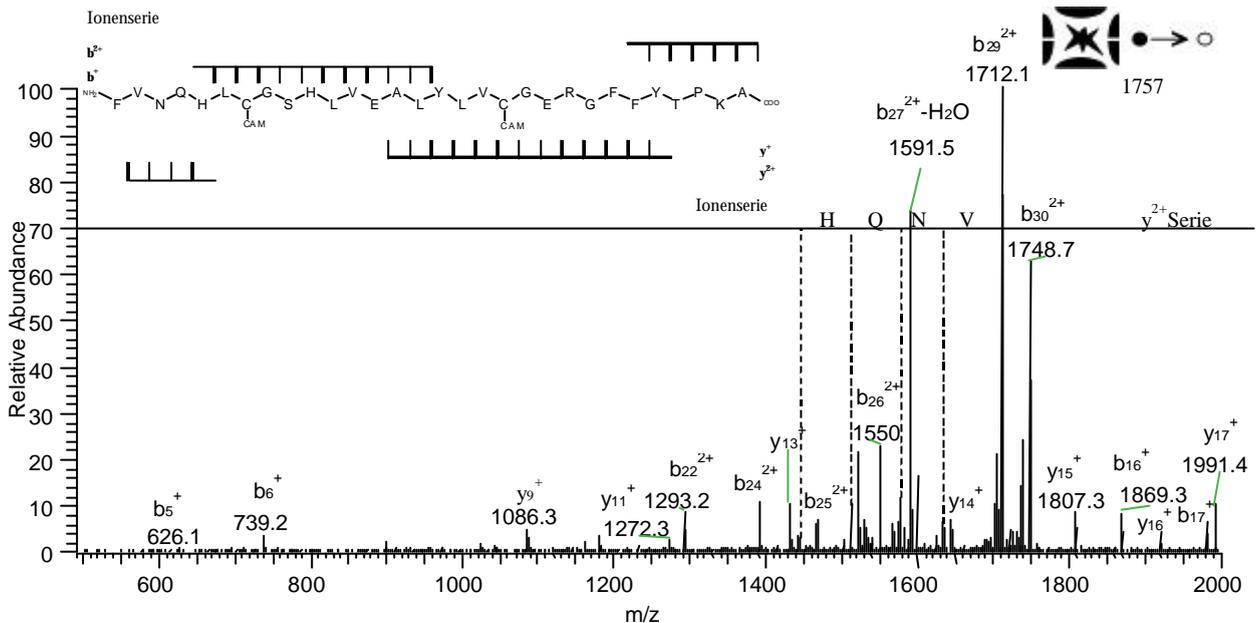


Abbildung 63: ESI-MS<sup>2+</sup>-Spektrum des Molekül-Ions  $[M+2H]^{2+}$  der carbamidierten B-Kette des Rinder-Insulins. Die Sequenz der B-Kette ist abgebildet (FVNQHLC<sub>CAM</sub>GSH<sup>10</sup>LVEALYLVC<sub>CAM</sub>G<sup>20</sup>ERGFYTPKA) und zeigt die auftretenden Fragment-Ionen.

Die Fragment-Ionen der y-Serie treten in den gleichen Ladungszuständen wie die b-Fragment-Ionen auf. Auch hier gibt es im *ipso*-Ladungszustand eine Serie von y-Fragmenten ( $y_{28}^{2+}$  bis  $y_{25}^{2+}$ ), die Sequenzinformationen über den N-Terminus liefern. Die einfach geladene y-Fragment-Ionenserie ( $y_{17}^+$  bis  $y_5^+$ ) korrespondiert mit der b-Fragment-Ionenserie.

Die zwei Protonen im Molekül sorgen für eine gleichmäßige Fragmentierung. Da Lysin die vorletzte Aminosäure im Peptid ist, ähnelt die B-Kette des Rinder-Insulins einem Peptid, das durch limitierten tryptischen Verdau entstanden ist. Das Entstehen von zwei Fragment-Ionenserien deutet daraufhin, dass die zwei Ladungen auf den Enden der Peptidkette verteilt sind.

Die  $y^+$ -Fragmente sind durch einen *charge-site-induced* Mechanismus entstanden, da nach dem Bindungsbruch die zweite Ladung auf des y-Fragment übertragen wird. Es zeigt sich, dass das  $y_{25}^{2+}$ -Fragment als kleinstes zweifach geladenes y-Fragment auftritt. Es entstehen keine weiteren zweifach geladenen y-Fragmente sondern einfach geladene b-Fragmente ( $b_5^+$  bis  $b_{17}^+$ ). Die Protonen verteilen sich gleichmäßig auf dem Peptid, obwohl theoretisch eine zweifache

Protonierung der  $y$ -Fragmente möglich ist. Dies wird deutlich im Fragment-Ionenspektrum des dreifach geladenen Molekül-Ions ( $m/z$  1172), in dem die Serie der  $y^{2+}$ -Fragmente bis  $y_{18}^{2+}$  zu detektieren ist (siehe Abbildung 64).

### 5.4.1.2 Fragmentierung des Molekül-Ions $[M+3H]^{3+}$ der carbamidierten B-Kette

Das Spektrum enthält intensive Fragment-Ionen beider Fragment-Ionenserien. Dreifach geladene  $b$ -Ionen sind  $b_{30}^{3+}$  und  $b_{29}^{3+}$ . Mit dem  $b_{27}^{2+}$ -Fragment-Ion (bzw.  $[b_{27}-H_2O]^{2+}$ ) beginnt die zweifach geladene  $b$ -Fragment-Ionenserie ( $b_{27}^{2+}$  bis  $b_{13}^{2+}$ ), da  $b_{28}^{2+}$  wegen des Prolin-Effektes (Pro-Lys) nicht gebildet wird. Die Serie der zweifach geladenen Fragmente geht bis  $b_{13}^{2+}$ , wobei die Intensitäten deutlich abnehmen. Die einfach geladenen Fragment-Ionen  $b_5^+$  und  $b_6^+$  ergeben nur die Information eines Leucins oder Isoleucins in der Sequenz. Mit geringer Intensität treten noch die Fragment-Ionen  $b_{15}^+$  und  $b_{16}^+$  auf.

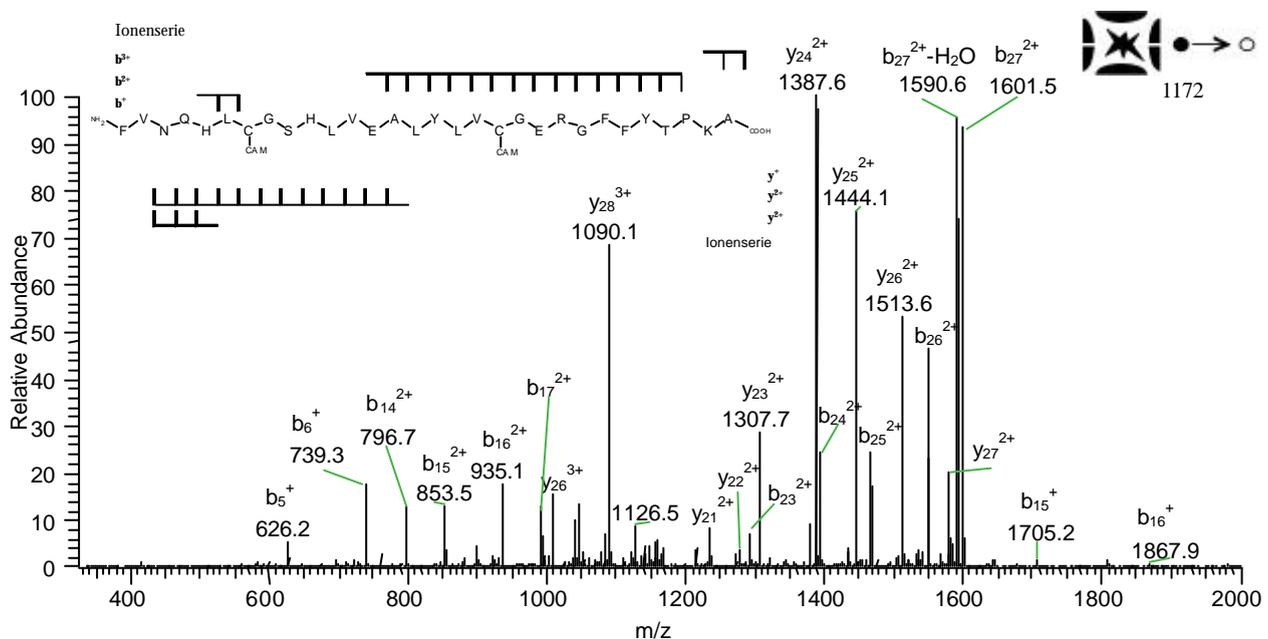


Abbildung 64: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Molekül-Ions  $[M+3H]^{3+}$  der carbamidierten B-Kette; Es entstehen hauptsächlich zweifach geladene Fragment-Ionen wie aus der abgebildeten Sequenz zu erkennen ist. Unterhalb der Sequenz sind  $y$ -Fragmente dargestellt, oberhalb  $b$ -Fragmente.

Von den  $y$ -Fragmenten sind einige dreifach geladene Fragmente ( $y_{28}^{3+}$ ,  $[y_{27}-H_2O]^{3+}$  und  $y_{26}^{3+}$ ) vorhanden. Die Möglichkeiten für die beiden N-terminalen Aminosäuren schränken sich durch die Masse von 246 Da auf einige wenige Kombinationen von Dipeptiden ein. Durch die Untersuchung des zweifach geladenen Molekül-Ions der carbamidierten B-Kette des Rinder-Insulins (siehe 5.4.1.1) konnte die N-terminalen Aminosäuresequenz bereits bestimmt werden. Durch die Serie der  $y^{2+}$ -Fragmente ( $y_{28}^{2+}$  bis  $y_{21}^{2+}$ ) lassen sich 7 Aminosäuren im N-terminalen Bereich bestimmen. Die Intensität der  $y$ -Serie ist größer als die der  $b$ -Serie. Einfach geladene  $y$ -Fragment-Ionen lassen sich nicht detektieren.

Durch die intensive Fragmentierung der Termini der Peptidkette liegt die Vermutung nahe, dass bei drei Protonen das Lysin und der N-Terminus als Ladungsträger protoniert sind. Das dritte Proton verteilt sich als „mobiles“ Proton über das gesamte Peptid und kann so durch den *charge-site-induced* Mechanismus zur Bildung von  $y^{2+}$ -Fragmenten beitragen. Das Auftreten weniger dreifach geladener b-Fragmente zeigt eine Lokalisation der Ladung am Lysin. Das  $b_{27}$ -Fragment kommt, obwohl es aufgrund seiner Größe und der Anzahl seiner basischen Zentren her drei Protonen tragen könnte, nur im zweifachen Ladungszustand vor. Genau diesem Ion ( $b_{27}$ ) fehlt aber das Lysin als potentieller Ladungsträger.

### 5.4.1.3 Fragmentierung des Molekül-Ions $[M+4H]^{4+}$ der carbamidierten B-Kette

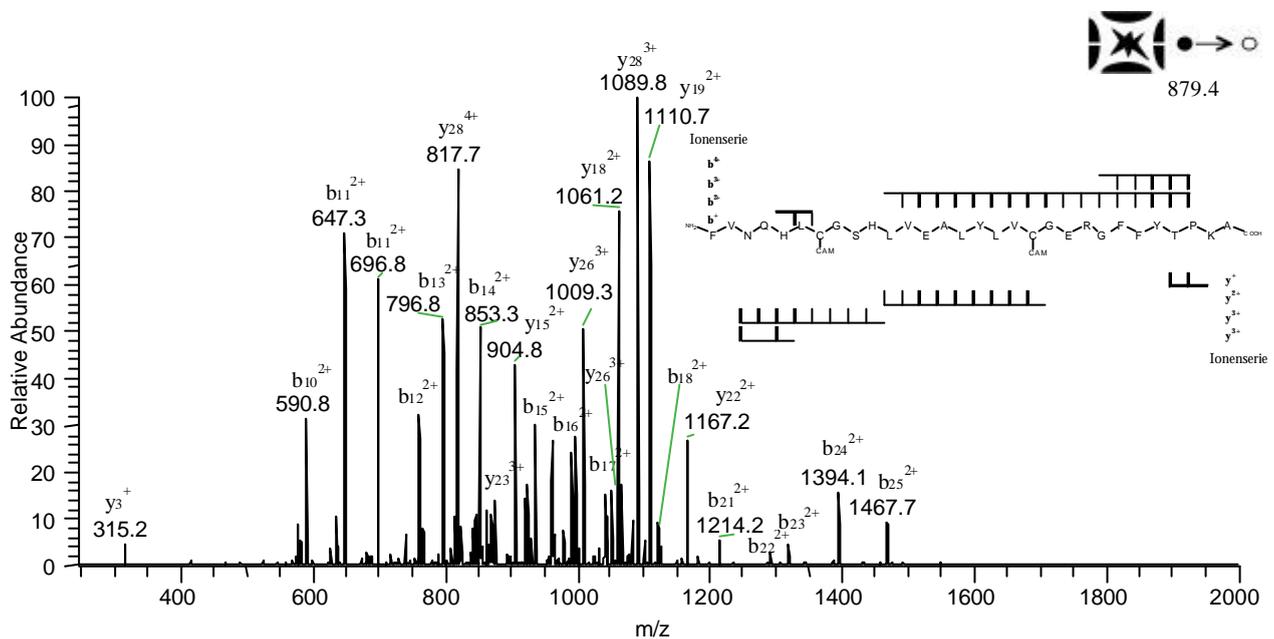


Abbildung 65: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Molekül-Ions  $[M+4H]^{4+}$  der carbamidierten B-Kette.

Das Spektrum zeigt eine intensive Fragmentierung des Molekül-Ions  $[M+4H]^{4+}$ . Vierfach geladene b-Fragmente lassen sich nicht detektieren. Nur unter Verlust einer Ladung kommen stabile b-Fragment-Ionen im dreifachen Ladungszustand vor ( $b_{27}^{3+}$ ). Sowohl die zweifach als auch die dreifach geladene b-Fragment-Ionenserie beginnen mit dem  $b_{27}$ -Fragment, welches durch den Prolin-Effekt (Bindungsbruch Thr-Pro) bevorzugt entsteht. Durch die dreifach geladenen b-Fragment-Ionen ( $b_{27}^{3+}$  bis  $b_{29}^{3+}$ ) lassen sich nur vier Aminosäuren bestimmen. Die Sequenzinformation wird aber durch die zweifach geladene Ionenserie ( $b_{27}^{2+}$  bis  $b_{10}^{2+}$ ) bestätigt und bis  $b_{10}^{2+}$  fortgeführt. Kleinere b-Ionenfragmente ( $b_6^+$  bis  $b_2^+$ ) geben erstmals Sequenzinformationen über den N-terminalen Bereich.

Die y-Fragment-Ionen ( $y_{28}^{4+}$  und  $y_{26}^{4+}$ ) sind die einzigen Fragmente, die im *ipso*-Ladungszustand zu detektieren sind. Die dreifach geladene y-Fragment-Ionenserie ( $y_{28}^{3+}$  bis  $y_{21}^{3+}$ ) bestätigt die beobachteten b-Fragment-Ionen ( $b_6^+$  bis  $b_2^+$ ). Die um eine weitere Ladung erniedrigte  $y^{2+}$ -Ionenserie ( $y_{20}^{2+}$  bis  $y_{12}^{2+}$ ) beginnt dort, wo die  $y^{3+}$ -Serie endet.

Wie in Abbildung 65 anhand der Sequenz zu erkennen ist, decken die Fragmentierungen nahezu die gesamte Sequenzinformation ab. Eine Interpretation des Spektrums bei Nichtkenntnis der Aminosäuresequenz wäre dennoch schwierig, da die Ionen in verschiedenen Ladungszuständen vorkommen und eine Zuordnung zu den einzelnen Fragment-Ionenserien (b oder y) nicht möglich ist.

#### 5.4.1.4 Fragmentierung des Molekül-Ions $[M+5H]^{5+}$ der carbamidierten B-Kette

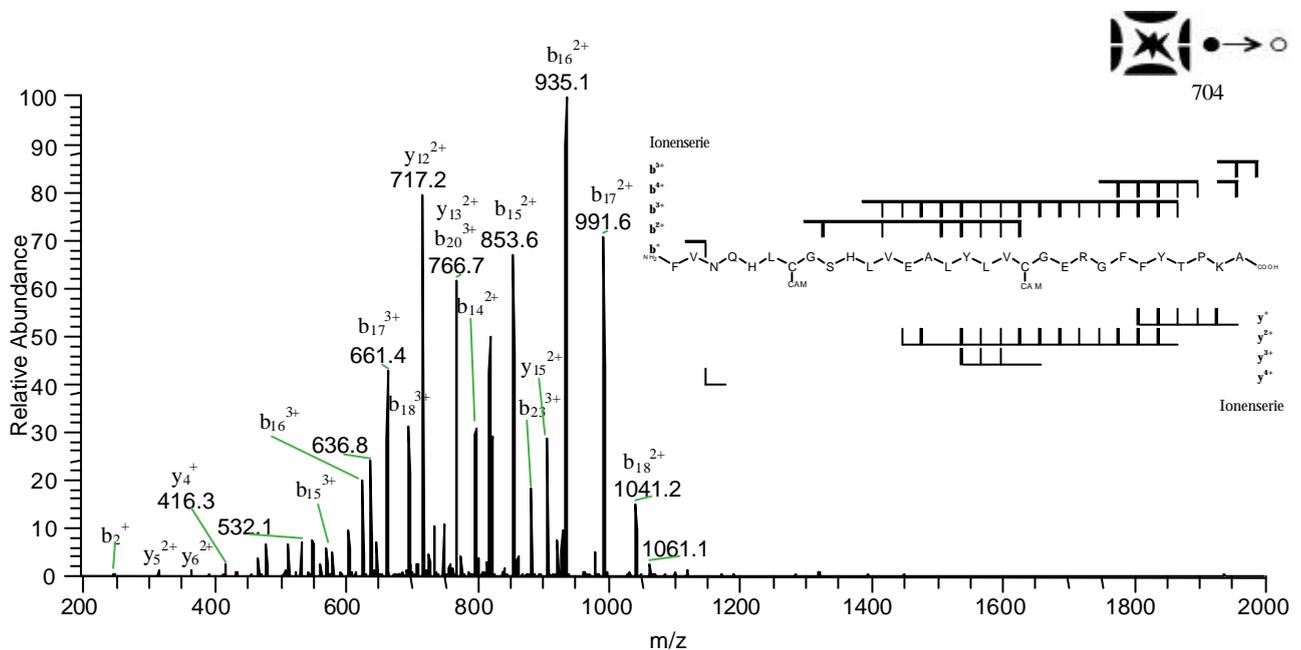


Abbildung 66: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Molekül-Ions  $[M+5H]^{5+}$  der carbamidierten B-Kette.

Das Spektrum des Molekül-Ions  $[M+5H]^{5+}$  der carbamidierten B-Kette zeigt intensive Fragment-Ionenbildung, die vorwiegend durch Bindungsbrüche auf der C-terminalen Hälfte des Proteins entstanden ist (siehe Skizze in Abbildung 66). Dabei entstehen vorwiegend b-Fragment-Ionen, deren Ladungszustand von der Länge der b-Fragment-Ionen abhängig ist. Das heißt, je kürzer das Fragment ist, desto weniger Ladungen sind auf dem Fragment-Ion vorhanden. Die übrigen Ladungen verbleiben auf den korrespondierenden y-Fragmenten und ergeben entsprechende y-Fragment-Ionenserien.

Die vierfach geladene  $b^{4+}$ -Ionenserie umfasst nur wenige Fragment-Ionen ( $b_{28}^{4+}$ - $b_{25}^{4+}$ ). Die korrespondierenden  $y^+$ -Fragmente ( $y_3^+$ - $y_6^+$ ) sind vorhanden. Bei den intensiven dreifach geladenen  $b^{3+}$ -Fragment-Ionen ( $b_{26}^{3+}$  bis  $b_{12}^{3+}$ ) zeigt sich, dass die korrespondierende  $y^{2+}$ -Fragment-Ionenserie ( $y_{15}^{2+}$  bis  $y_5^{2+}$ ) die gleiche Sequenzinformation wie die  $b$ -Ionenserie abdeckt. Das gleiche gilt für die  $b^{2+}$ -Fragment-Ionenserie ( $b_{17}^{2+}$ - $b_{15}^{2+}$ ) und die korrespondierende dreifach geladene  $y$ -Fragment-Ionenserie ( $y_{13}^{3+}$ - $y_{15}^{3+}$ ). Die Skizze der entstandenen Fragment-Ionenserien (siehe Abbildung 66) zeigt, dass die Ausbildung von korrespondierenden Fragment-Ionenserien die identische Sequenzinformation erbringt. Die Reaktion, die zur Ausbildung korrespondierender Fragment-Ionenserien führen wird auch als Ladungstrennung (*charge-separation* Reaktion) bezeichnet.

Durch die unterschiedlichen Ladungszustände der Fragment-Ionen, die bei der Fragmentierung mehrfach geladenen Vorläufer-Ionen auftreten können (*charge-separation*), ist eine Interpretation des Spektrums schwierig, da die Zuordnung zu den einzelnen Fragment-Ionenserien nicht direkt aus dem Spektrum zu erkennen ist. Zum anderen lassen sich bei der Interpretation vermutete Teilsequenzen daran überprüfen, ob sie durch die korrespondierende Fragment-Ionenserie belegt werden können.

Im Vergleich zu Spektren von geringeren Ladungszuständen fällt auf, dass Prolin nicht die dominante Bruchstelle im Peptidrückrat ist. Statt dessen findet eine intensive Fragmentierung in der Mitte des Peptids statt (Verweis 5.4.2).

Auffällig ist, dass ausschließlich Fragmentierungen im Mittelteil und im C-terminalen Bereich des Peptids stattfinden. Die dreifach geladene  $b$ -Ionenserie ( $b_{25}^{3+}$ - $b_{12}^{3+}$ ) beginnt dort, wo die vierfach geladene  $b$ -Ionenserie mit  $b_{24}^{4+}$  endet. Auf den Fragment-Ionen können keine Ladungen mehr stabilisiert werden. Statt dessen zerfallen sie in drei und zweifach geladene Fragment-Ionenserien, die wieder deutlich größere Intensitäten besitzen.

Fragmentierungen im Bereich des N-Terminus finden nicht mehr statt (außer Bildung von  $y_8^{4+}$ ). Dabei sollte durch Ladungstrennung ein  $b_2^+$ -Fragment ( $m/z$  247) entstehen, welches nur mit geringer Intensität detektierbar ist. Eine weitere Fragmentierung im Bereich des N-Terminus, wie sie für das Molekül-Ion  $[M+4H]^{4+}$  beobachtet wird, findet nicht statt. Durch die fünfte Ladung ist der N-Terminus protoniert worden, um die Ladungen möglichst äquidistant auf dem Vorläufer-Ion zu verteilen. Dadurch ist die Protonierung der Peptidbindungen nicht mehr gleichmäßig über das Peptid verteilt. Besonders im N-terminalen Bereich finden keine Bindungsbrüche statt. Es wird lediglich das N-terminale Dipeptid ( $[Phe-Val]^+$ ) abgespalten (Entstehung von  $y_{28}^{4+}$ ).

### 5.4.2 Vergleich des Fragmentierungsverhaltens der carbamidierten B-Kette bei unterschiedlichen Ladungszuständen der Vorläufer-Ionen

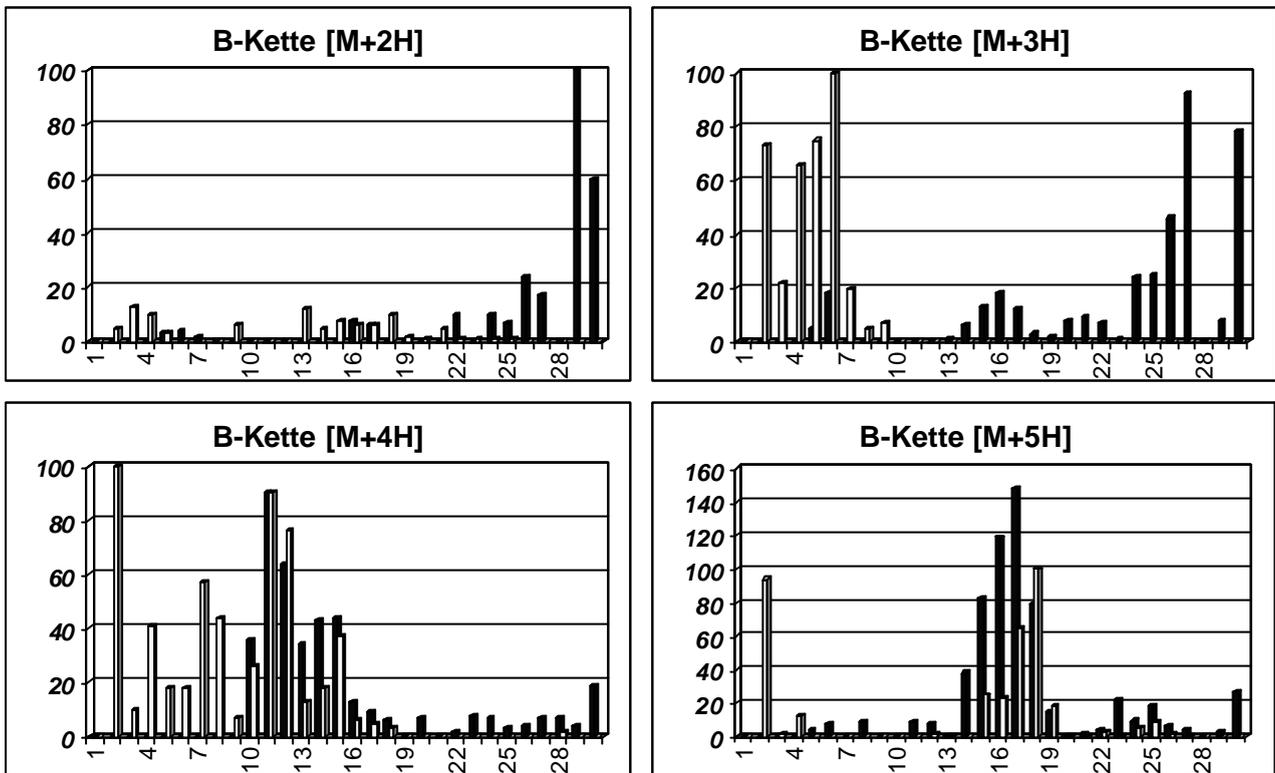


Abbildung 67: Fragmentierungsverhalten der carbamidierten B-Kette von Rinderinsulin in Abhängigkeit vom Ladungszustand des Vorläufer-Ions. Die auf der y-Achse aufgetragenen relativen Intensitäten der Fragment-Ionen erreichen Werte über 100 %, wenn das gleiche Fragment in verschiedenen Ladungszuständen vorkommt (siehe unten rechts, B-Kette [M+5H]).

Das Fragmentierungsverhalten der carbamidierten B-Kette des Rinder-Insulins wird durch den Ladungszustand entscheidend beeinflusst. Der Vergleich zeigt, dass der Ladungszustand +4 (siehe Abbildung 67, links unten) die meisten und die intensivsten Fragmentierungen aufweist. Die Sequenzabdeckung ist nahezu vollständig, wenn auch die Intensitäten im C-terminalen Bereich gering (Aminosäureposition 22 bis 30) sind. Im Ladungszustand +3 sind die Lücken um die basischen Aminosäuren (Position 20-23, GERG) besonders deutlich zu erkennen. Durch die Ladung in der Seitenkette des Arginin wird hier eine gleichmäßige, durchgehende Fragmentierung verhindert. Die Fragmentierung neben der Aminosäure Glycin ist ebenfalls nur gering, so dass die Information über die Aminosäuresequenz nicht oder nur wenig durch die Fragment-Ionen belegbar ist.

Im fünffachen Ladungszustand zeigt die carbamidierte B-Kette eine besonders intensive Fragment-Ionenbildung (relative Intensitäten > 100 durch gleiche Fragment-Ionen in verschiedenen Ladungszuständen) im mittleren Bereich des Peptids. Die Fragment-Ionenserien geben allerdings wenig Sequenzinformationen über N-Terminus und C-Terminus.

Der Vergleich mit dem Fragmentierungsverhalten von Br-TPP (Alkylierung mit Brom-Ethyl-triphenylphosphin) Derivaten der B-Kette des Rinder-Insulins zeigt den gleichen Effekt (siehe 5.4.7). Durch die Derivatisierung mit Br-TPP wird eine feste Ladung an den N-Terminus gebracht, weshalb der Rückschluss nahe liegt, dass die fünfte Ladung in der underivatisierten B-Kette des Rinder-Insulins ebenfalls ein feste Ladung am N-Terminus besitzt. Da bei niedrigeren Ladungszuständen Fragmentierungen im N-terminalen Bereich stattfinden, ist zu vermuten, dass die Ladungen mit zunehmendem Protonierungsgrad auf die basischen Zentren verteilt werden.

Im Ladungszustand +3 und +4 sind genügend Protonen vorhanden, um intensive Fragmentierungen im N-terminalen Bereich zu ermöglichen, ohne dass durch eine Ladungslokalisierung am N-Terminus Fragmentierungen unterbunden werden könnten.

### 5.4.3 Acetylierung der B-Kette des Rinder-Insulins

Im Spektrum des Reaktionsproduktes sind als Hauptpeaks  $[M+2H]^{2+}$  (1799.7) und  $[M+3H]^{3+}$  (1200.7) zu erkennen. Nach Dekonvolution ergibt sich ein Molekulargewicht von 3598 (theor.: 3597), was einer zweifachen Acetylierung der carbamidierten B-Kette des Rinder-Insulins entspricht. Ein vierfach protoniertes Vorläufer-Ion ( $m/z$  900.4) lässt sich nicht detektieren. Durch die Derivatisierung werden die bevorzugten Protonierungsstellen im Peptid in ihrer Protonenaffinität erniedrigt. Aus den primären Amin-Funktionen des Lysins und des N-Terminus wird ein sekundäres Amid, welches den Amidgruppen in der Peptidkette hinsichtlich der Basizität ähnelt. Das Ziel der Derivatisierung, nämlich die Erniedrigung des Protonierungsgrades der acetylierten B-Kette des Rinder-Insulins, konnte somit durch das  $MS^1$ -Spektrum belegt werden.

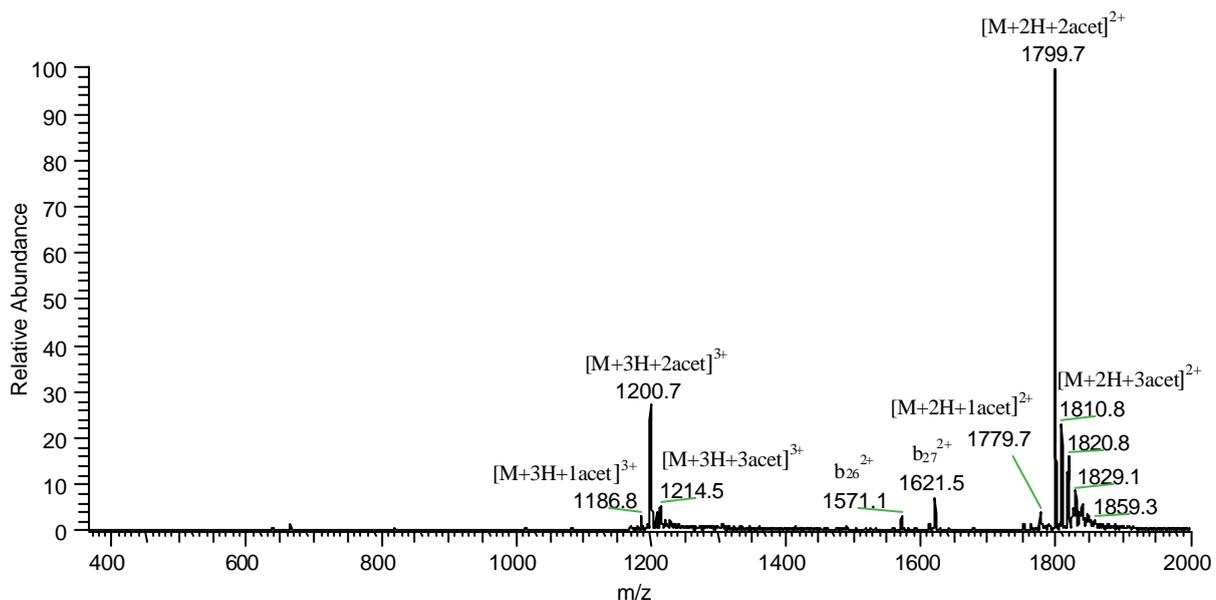


Abbildung 68:  $MS^1$ -Spektrum der acetylierten B-Kette des Rinder-Insulins. Als Hauptpeaks sind die Molekül-Ionen  $[M+2H]^{2+}$  und  $[M+3H]^{3+}$  zu beobachten.

Als Nebenprodukte lassen sich noch Molekül-Ionen mit einer dreifachen Acetylierung ( $m/z$  1820.6 und 1214.5) sowie Molekül-Ionen mit einer einfachen Acetylierung detektieren ( $m/z$  1186.8). Die Intensität dieser Ionen ist allerdings vergleichsweise gering. Die Ionen mit der Masse  $m/z$  1571.1 und 1621.5 sind Fragment-Ionen, die schon bei der Ionisation in der Ionenquelle entstanden sind (*orifice-fragmentation*). Sie unterscheiden sich nicht von den Fragment-Ionen der anschließenden MS/MS-Experimente.

#### 5.4.3.1 Fragmentierung des Molekül-Ions $[M+2H]^{2+}$ der acetylierten B-Kette

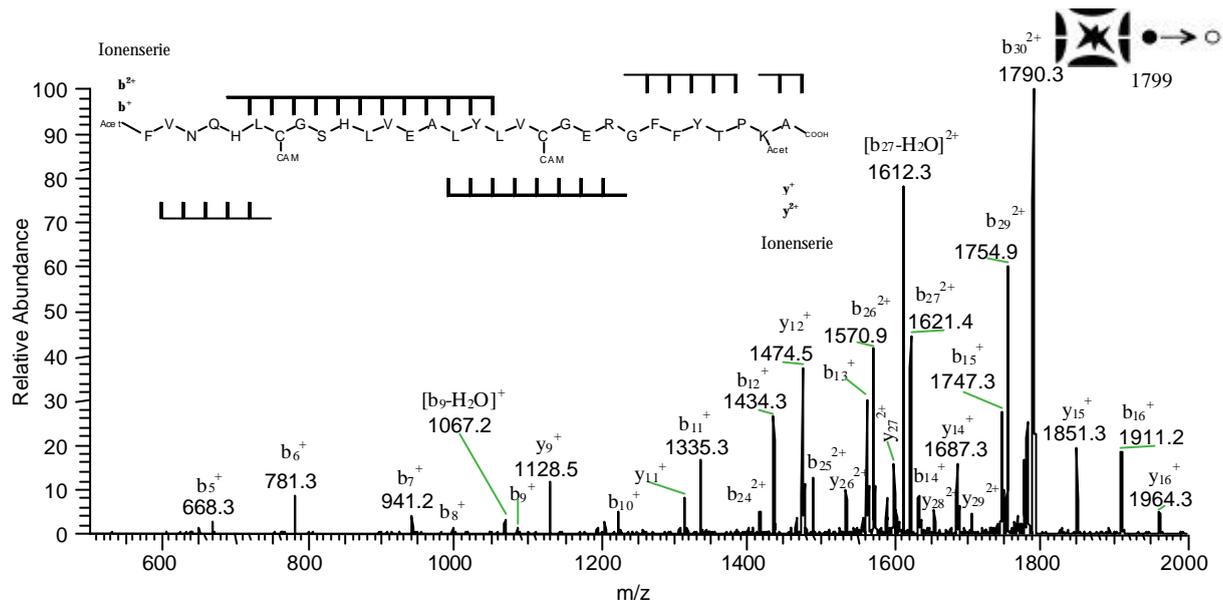


Abbildung 69: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum der acetylierten B-Kette  $[M+2H]^{2+}$ .

Das Spektrum zeigt eine Reihe von intensiven Fragment-Ionen im *ipso*<sup>XIV</sup>-Ladungszustand sowie einfach geladene Fragment-Ionen. Die Ionen der  $b^{2+}$ -Fragment-Ionenserie ( $b_{30}^{2+}$  bis  $b_{23}^{2+}$ ) sind vorhanden, zeigen jedoch intensive Fragmentierungen durch Neutralverlust von Wasser (z. B.  $[b_{27}-H_2O]^{3+}$   $m/z$  1612.3). In anderen Spektren finden sich diese Art von Ionen mit einer maximalen Intensität von 10 bis 20% des zugehörigen Fragment-Ions, aus dem sie durch Wasserverlust entstanden sind.

Die b-Fragment-Ionenserie wird im einfachen Ladungszustand fortgesetzt ( $b_{16}^+$  bis  $b_5^+$ ). Aufgrund des  $m/z$ -Bereiches bis 2000 sind größere  $b^+$ -Fragmente nicht zu detektieren. Die einfach geladenen b-Fragmente sind besonders im niedrigen Massenbereich sehr intensiv ( $b_5$ ,  $b_6$ ,  $b_{10}$ ).

<sup>XIV</sup> *ipso*-Ladungszustand entspricht dem des Vorläufer-Ions

Das Ion  $m/z$  1067.3 (siehe Abbildung 69) ist aufgrund seines Isotopenmusters als einfach geladenes Ion zu identifizieren. Es handelt sich um ein  $[b_9-H_2O]^+$ -Fragment-Ion (FVNQHLC<sub>CAM</sub>GS). Obwohl  $b_{10}^+$  ( $m/z$  1222.3) ebenfalls einen Neutralverlust von Wasser ( $m/z$  1204.3) zeigt, ist das C-terminale Serin in der Lage durch Cyclisierung Wasser zu eliminieren (siehe Abbildung 70). Für andere Ionen, die ebenfalls einen Wasserverlust zeigen könnte das Serin weiterhin in der Kette einen

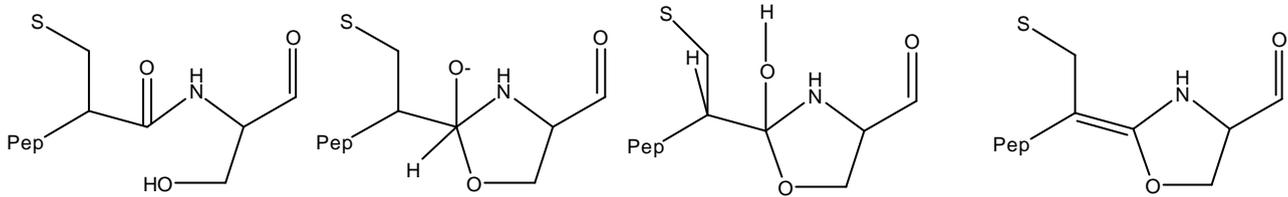


Abbildung 70: Möglicher Mechanismus der spezifischen Wassereliminierung durch Serin.

Ringschluss unter Ausbildung eines Heterofünfrings bewirken. In der underivatisierten B-Kette des Rinder-Insulins findet sich ebenfalls ein  $[b_9-H_2O]^+$ -Fragment-Ion ( $m/z$  1025), dessen Intensität aber im Verhältnis zum  $b_9^+$ -Fragment-Ion nicht so dominant ist.

Die  $y$ -Fragment-Ionen sind vertreten durch die *ipso*-Ionenserie ( $y_{29}^{2+}$  bis  $y_{25}^{2+}$ ) und eine Reihe von intensiven einfach geladenen  $y$ -Fragmenten ( $y_{16}^+$  bis  $y_{10}^+$ ). Von den zweifach geladenen Vorläufer-Ionen ist so ein Maximum an Sequenzinformationen erhalten worden.

Im Vergleich zum underivatisierten Peptid lassen sich einige Fragment-Ionen aufgrund des Massezuwachses durch die Acetylierung ( $\Delta = 42$  Da) nicht mehr detektieren ( $m/z$  größer 2000). Durch die Acetylierung konnte aber zwischen den Residuen Gln und Lys<sup>XV</sup> unterschieden werden, da die Residuenmasse von acetyliertem Lysin 170 Da beträgt. Damit ist auch die Möglichkeit ausgeschlossen, dass sich die Residuenmasse von 128 Da aus Gly (Residuenmasse 57) und Ala (Residuenmasse 71) zusammensetzt.

Die Ionen der  $y^{2+}$ -Fragment-Ionenserie ( $y_{29}^{2+}$  bis  $y_{24}^{2+}$ ) sind intensiv genug den N-Terminus zu identifizieren. Eine Reihe einfach geladener  $y$ -Fragmente ( $y_{16}^+$  bis  $y_9^+$ ) ergibt Sequenzinformationen über den mittleren Teil Aminosäuresequenz. Die Serie endet mit dem  $y_9^+$ -Fragment, was durch Bindungsbruch (Glu-Arg) vor dem Arginin entstanden ist. Weitere einfach geladene  $y$ -Fragmente existieren nicht. Vermutlich ist Arginin als basische Aminosäure protoniert, so dass kleinere  $y$ -Fragmente, die nur ein acetyliertes Lysin besitzen, keine Ladung tragen können. Durch die dreifache Protonierung (siehe 5.4.3.2 und Abbildung 71) ist die Bildung von  $y_4^+$  und  $y_3^+$  als einfach geladene Fragment-Ionen (ohne dass sie ein Arginin enthalten) wieder möglich. Durch das dritte Proton wird der C-Terminus protoniert.

<sup>XV</sup> Residuenmasse Gln = Residuenmasse Lys = 128 Da

### 5.4.3.2 Fragmentierung des Molekül-Ions $[M+3H]^{3+}$ der acetylierten B-Kette

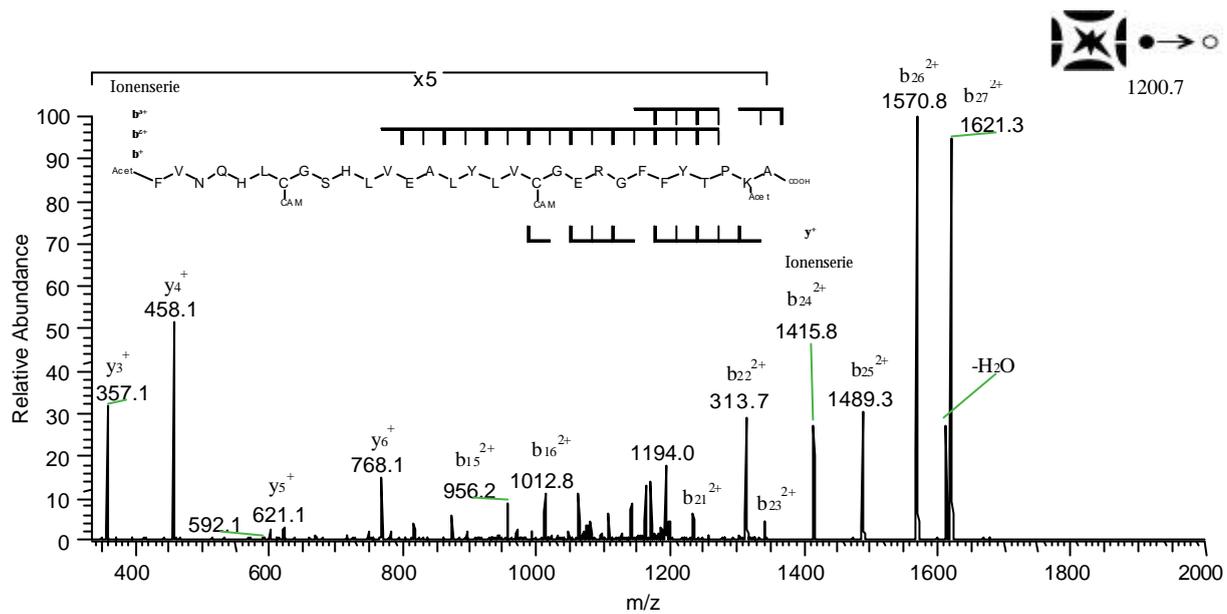


Abbildung 71: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum der acetylierten B-Kette  $[M+3H]^{3+}$ . Der m/z Bereich bis 1350 ist um den Faktor fünf vergrößert, um einzelne Fragment-Ionen hervorzuheben.

Durch die zweifache Acetylierung der B-Kette des Rinder-Insulins sind der N-Terminus und Lysin nicht mehr als Ladungsträger bevorzugt. Als mögliche Ladungsträger kommen noch Arginin oder Histidin in Frage, ansonsten sind die Ladungen als mobile Protonen aufzufassen.

Der Basispeak bzw. die zwei intensivsten Fragment-Ionen ( $m/z$  1570.8 und  $m/z$  1621.3) sind schon im MS-Spektrum als Fragmente der *in-source* Fragmentierung aufgetreten (siehe 5.4.3). Sie gehören zur zweifach geladenen Fragment-Ionenserie ( $b_{27}^{2+}$  bis  $b_{13}^{2+}$ ). Von der *ipso*-b-Fragment-Ionenserie ( $b_{30}^{3+}$  bis  $b_{25}^{3+}$ ) sind bis auf  $b_{28}^{3+}$  die Ionen zur Charakterisierung des C-Terminus vollständig. Durch die Derivatisierung konnte der Prolineffekt (Bindungsbruch Thr-Pro) nicht unterdrückt werden.

Die Ionen 1164.3, 1170.9 und 1075.3 können einer dreifach geladenen b-Ionenserie ( $b_{29}^{3+}$  bis  $b_{27}^{3+}$ ) zugeordnet werden, die ein Molekül Wasser verloren hat. Dies würde bedeuten, dass bei gleichzeitigem Wasserverlust ein Bindungsbruch C-terminal zum Prolin (Bindungsbruch Pro-Lys) stattfinden könnte. Nominell entspricht  $m/z$  1170.9 einem  $[b_{28} - H_2O]^{3+}$  Ion. Gleichzeitig ist  $m/z$  1170.9 aber auch das  $b_{20}^{2+}$ -Fragment. Die Auflösung des Massenspektrometers genügt nicht, um aufgrund der Peakform entscheiden zu können, welchen Ladungszustand das bei  $m/z$  1170.9 detektierte Fragment besitzt.

Es gibt nur wenige y-Fragmente, die allerdings als kleine y-Fragmente ( $y_6^+$  bis  $y_3^+$ ) entsprechend intensiv sind. Sporadisch treten noch weitere y-Fragmente auf ( $y_8$ ,  $y_9$ ,  $y_{10}$ ,  $y_{12}$ ), deren Intensität allerdings verschwindend gering ist. Sie sind bei der intensiven b-Fragment-Ionenbildung durch Ladungstrennung entstanden.

#### 5.4.4 Einfluss der Acetylierung auf die Fragmentierung der B-Kette des Rinder-Insulins

Durch die Acetylierung sind die Basizitäten des N-Terminus und der Amino-Gruppe in der Seitenkette des Lysins verringert worden. Zunächst lässt sich im MS-Spektrum feststellen, dass die acetylierte B-Kette des Rinder-Insulins nur noch in den Ladungszuständen +2 und +3 detektiert wird. Die Fragment-Ionenspektren dieser Molekül-Ionen werden mit den Fragment-Ionenspektren der carbamidierten B-Kette des Rinder-Insulins verglichen, indem die Intensitäten der Fragment-Ionen gegen die Aminosäuresequenz aufgetragen wird. Dabei zeigen helle Balken die Intensitäten der y-Fragmente und dunkle Balken die der b-Fragment-Ionen.

Im Ladungszustand +2 konnte durch die Acetylierung eine Verbesserung der Fragmentierungs-Intensitäten erreicht werden. Besonders die Fragmentierung im mittleren Bereich des Peptids (Aminosäure 10 bis 16, siehe Abbildung 72 oben rechts) ist deutlich verbessert. Das  $b_{28}$ -Fragment (verhindert durch den Prolineffekt) kann in keinem der Fragment-Ionenspektren detektiert werden. Dies wird durch die graphische Darstellung besonders deutlich.

Im dreifachen Ladungszustand sind durch die Acetylierung  $b_n^{2+}$ -Fragmente entstanden. Es konnten keine y-Fragmente im gleichen Massenbereich des Spektrums detektiert werden. Dadurch ist das Spektrum einfacher zu interpretieren. Die wenigen entstandenen y-Fragmente ( $y_3^+$  bis  $y_6^+$ ) sind einfach geladen und besitzen eine so geringe Masse, dass sie bei der Interpretation nicht stören.

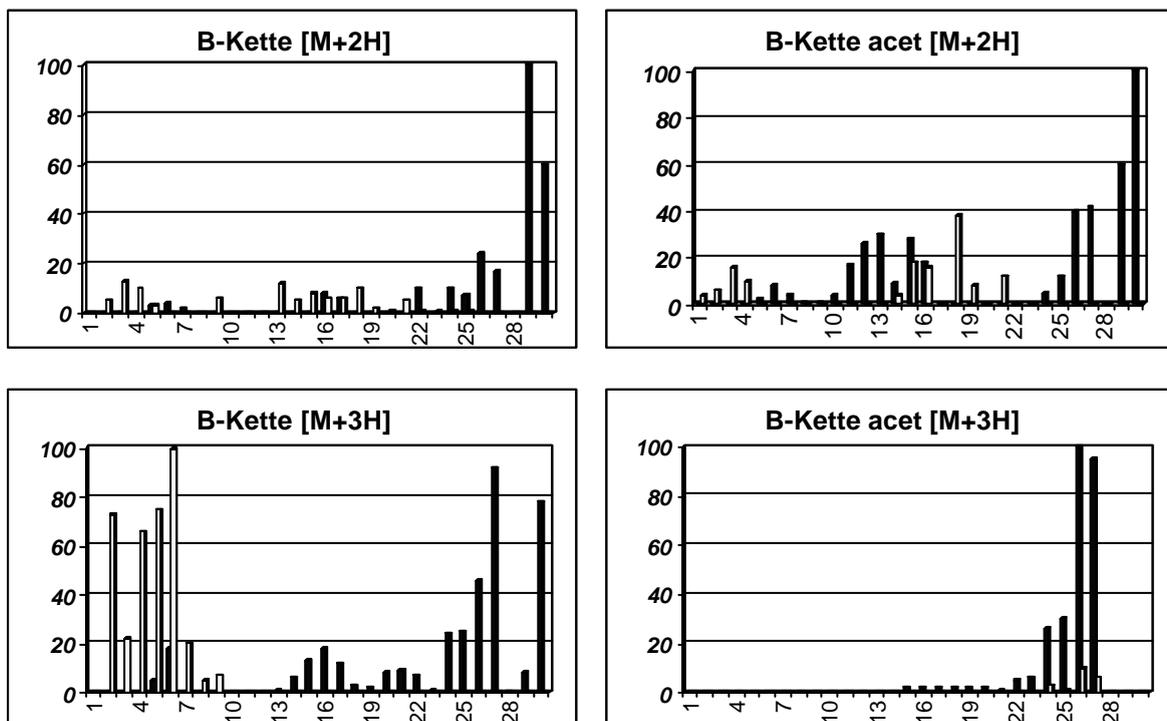


Abbildung 72: Vergleich der Fragmentierungen der B-Kette des Rinder-Insulins nach Acetylierung (acet), Ladungszustände +2 und +3; Hell: y-Fragment-Ionen, Dunkel: b-Fragment-Ionen.

Durch die Detektion der einfach geladenen  $y$ -Fragment-Ionen lässt sich die N-terminale Sequenz doppelt belegen.

Bindungsbrüche in der Nähe des N-Terminus finden durch die Acetylierung nur noch im Ladungszustand +2 (siehe Abbildung 72 rechts oben) statt. Im Ladungszustand +3 ist die Protonierung des Moleküls so verändert, dass kein mobiles Proton in der Nähe des N-Terminus vorhanden ist, um eine Fragmentierung in diesem Bereich zu induzieren. Es entstehen auch keine einfach geladenen  $b$ -Fragmente, die ohne Acetylierung (siehe Abbildung 72 links unten) noch zu detektieren sind. Durch die Acetylierung ist die Entstehung von Fragment-Ionen im N-terminalen Bereich im Ladungszustand +3 unterbunden worden.

### 5.4.5 Acylierung der B-Kette des Rinder-Insulins mit Bromnikotinsäure

Die Acylierungsreaktion mit BrNA-NHS sollte durch die positive Ladung den Ladungszustand erhöhen und durch das Brom eine Labelung der derivatisierten Fragmente erreichen. Es wurde das Bis-Derivat der B-Kette untersucht. Da sowohl N-Terminus als auch das Lysin derivatisiert worden sind, ergibt sich eine Labelung beider Fragment-Ionenserien.

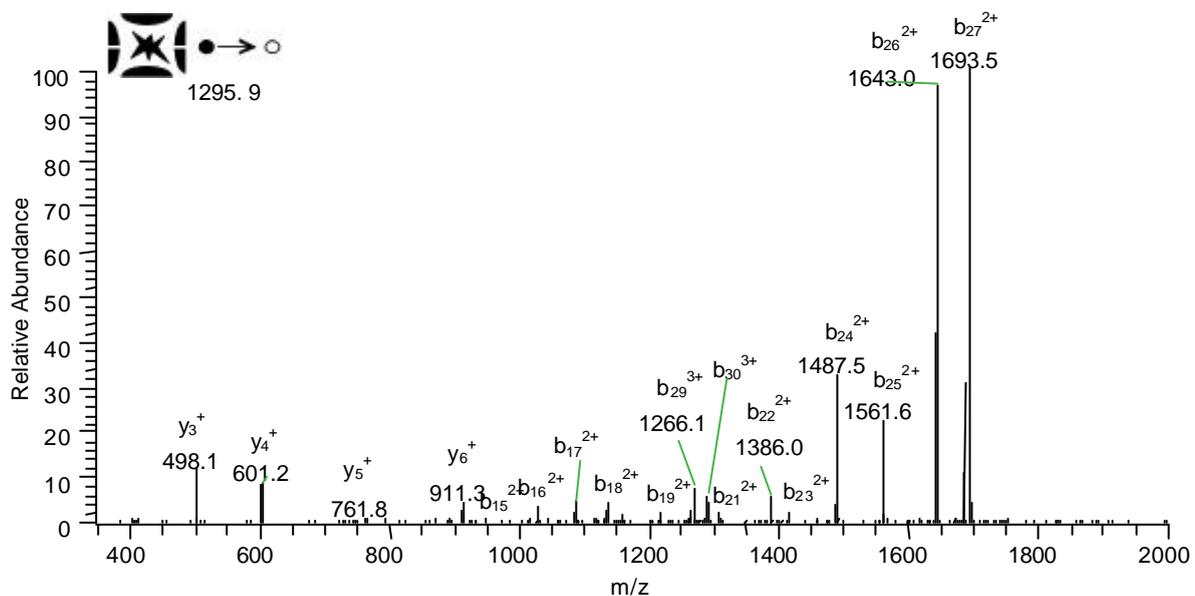


Abbildung 73: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Bisderivats der mit Brom-Nikotinsäure derivatisierten B-Kette des Rinder-Insulins.

Das Spektrum besteht vorwiegend aus  $b$ -Fragment-Ionen in unterschiedlichen Ladungszuständen. Die Serie ist durchgängig von  $b_{30}$  bis  $b_{15}$ , wobei nach  $b_{30}^{3+}$  und  $b_{29}^{3+}$  der Ladungszustand um eine Ladung erniedrigt ist ( $b_{27}^{2+}$  bis  $b_{15}^{2+}$ ). Dies steht im Einklang mit den wenigen relativ intensiven  $y$ -Fragment-Ionen ( $y_3^+$  bis  $y_6^+$ ), die durch Ladungstrennung entstanden sind. Die  $y$ -Fragment-Ionen besitzen die charakteristische Isotopenverteilung des Broms, das einen Doppelpeak ( $\Delta m = 2$  Da)

erzeugt. Bei den zweifach geladenen b-Fragmenten ist diese Isotopenverteilung nicht mehr zu erkennen.

Der Vergleich mit den Fragment-Ionen der underivatisierten B-Kette zeigt, dass nur noch Fragmentierungen im C-terminalen Bereich des Peptids stattfinden (siehe Abbildung 74). Diese Beobachtung konnte auch schon bei der Acetylierung des Peptids mit Essigsäureanhydrid gemacht werden. Ein weiterer Vergleich zeigt, dass bei der acetylierten und der mit BrNA acylierten Form die gleichen Fragment-Ionen auftreten. Zusätzlich sind die  $\gamma$ -Fragment-Ionen des BrNA-Derivats mit Bromatomen gelabelt, da eine Acylierung am Lysin stattgefunden hat. Theoretisch besitzen auch die b-Fragment-Ionen ein Br-Atom. Da aber der Ladungszustand der b-Fragment-Ionen +2 und +3 ist und durch die  $^{13}\text{C}$ -Isotopen eine Überlagerung der Brom-Isotopen stattfindet (siehe 2.7.4 Isotopenlabelung, S. 45), lassen sich die b-Fragment-Ionen nicht als Brom-haltige Fragmente detektieren.

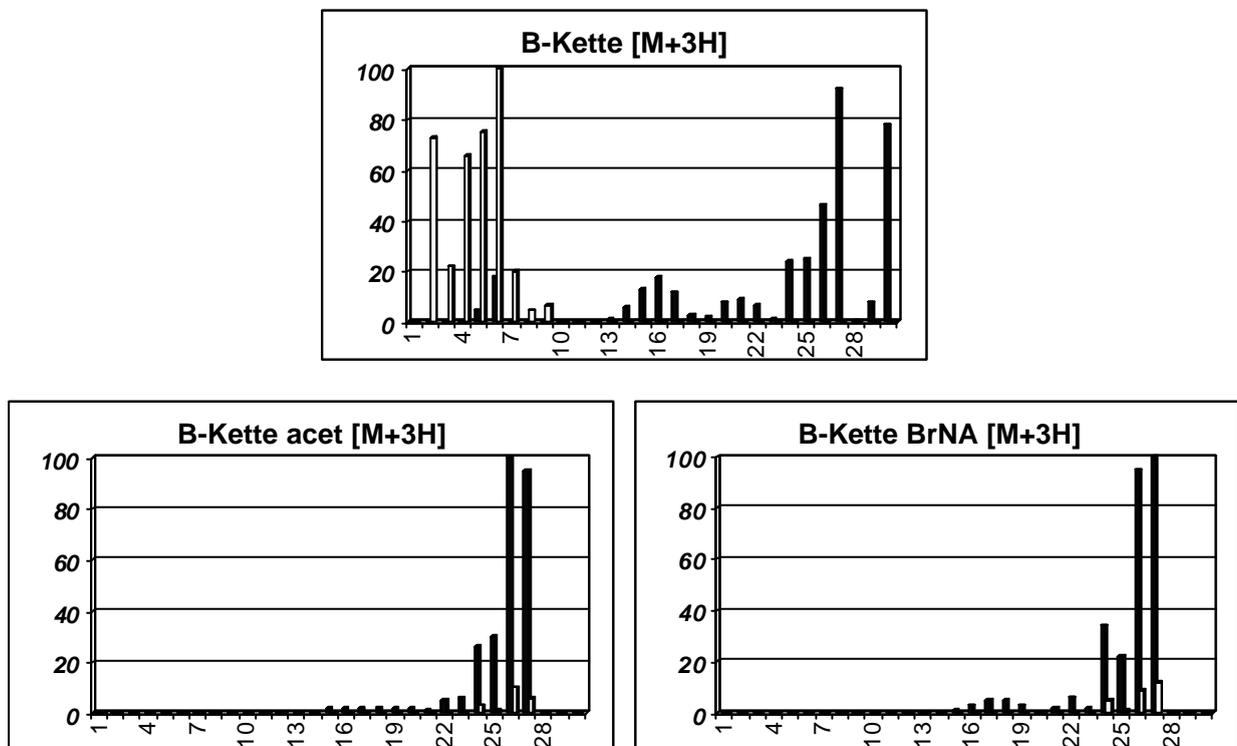


Abbildung 74: Vergleich der Fragmentierung der underivatisierten B-Kette und zweier Acylierungsderivate; der Vergleich zeigt nahezu identische Fragmentierungen der Derivate.

### 5.4.6 Alkylierung der B-Kette des Rinder-Insulins mit Brom-Ethyl-Triphenylphosphin

Durch die Derivatisierung soll über Brom-Ethyl-Triphenylphosphin (Br-TPP) eine stabilisierte Ladung am N-Terminus eingefügt werden. Als mögliche Reaktionszentren kommen Lysin und der N-Terminus in Frage. Für die einfache Derivatisierung muss mit einem Isomergemisch gerechnet werden (N-Terminus oder Lysin). Ein Molekül TPP als Derivat erhöht die Molekülmasse um 288 Da. Das Spektrum (siehe Abbildung 75) zeigt als Hauptprodukt die einfache Derivatisierung der B-Kette des Rinder-Insulins. Die zweifache Derivatisierung durch Br-TPP ist als Nebenprodukt entstanden, so dass auch von den Molekül-Ionen des Bis-Derivates Fragment-Ionenspektren

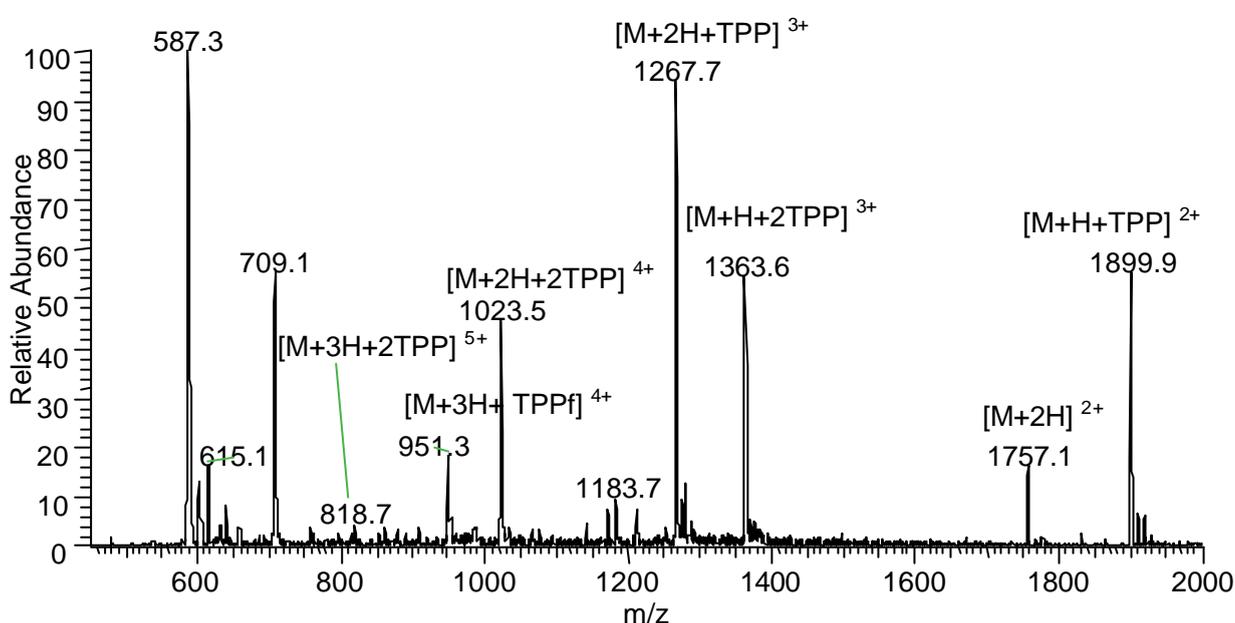


Abbildung 75: MS-Spektrum der B-Kette des Rinder-Insulins nach Derivatisierung mit Br-TPP. Es sind die Mono- und Bis-Addukte gebildet worden. Pro Addukt wird die Masse der B-Kette um 288 Da erhöht. Die Bezeichnung der Molekülionen geht von der carbamidierten B-Kette aus. Da TPP eine fixierte positive Ladung trägt ergibt sich der Ladungszustand aus der Summe der Protonen und der Anzahl der TPP Derivate.

angefertigt werden konnten. Folgende Ladungszustände wurden im MS<sup>2</sup>-Experiment untersucht: +6, +5, +4, +3 für das Mono-TPP-Derivat und +5, +4, +3, +2 für das Bis-TPP-Derivat. Bei den Peaks (m/z 587.3 bzw. 709) handelt es sich vermutlich um Verunreinigungen oder Nebenprodukte des Derivatisierungsreagenzes.

### 5.4.6.1 Fragmentierung des Mono-TPP-Derivats der B-Kette $[M+2H]^{3+}$

Das Fragment-Ionenspektrum besteht aus einem einzigen Signal ( $m/z$  1756), was dem zweifach geladenen Molekül-Ion  $[M+2H]^{2+}$  der carbamidierten B-Kette des Rinder-Insulins entspricht. Das TPP-Derivat ist abgespalten worden. Dabei ist die feste Ladung dem Peptid entrissen worden und vermutlich weiterhin auf dem TPP-Derivat lokalisiert. Ein direkter

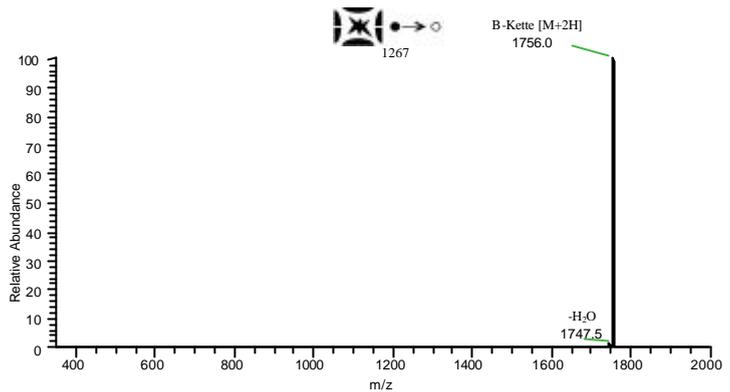


Abbildung 76: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Mono-TPP-Derivats der B-Kette  $[M+2H]^{3+}$ .

Beweis ist nicht möglich, da der detektierte Bereich (durch die Gerätetechnik bedingt) nur einen Massenbereich von 2000 bis 350 Da umfasst.

### 5.4.6.2 Fragmentierung des Mono-TPP-Derivats der B-Kette $[M+3H]^{4+}$

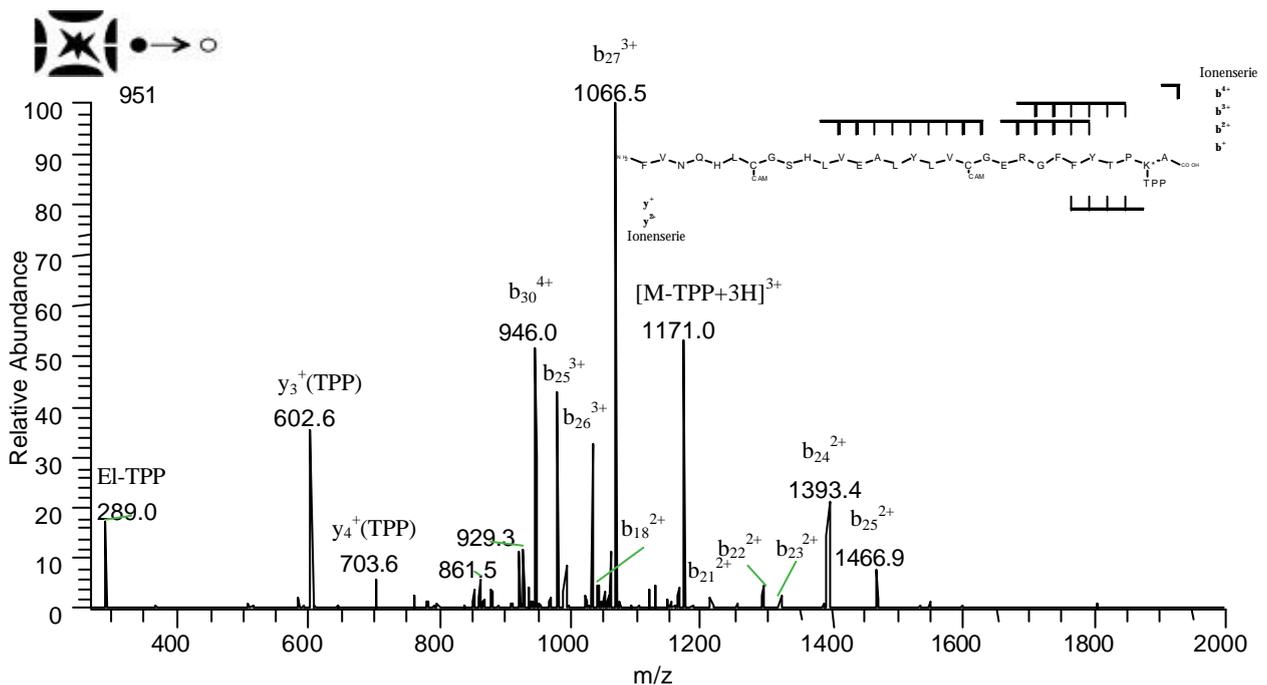


Abbildung 77: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Mono-TPP-Derivats der B-Kette  $[M+3H]^{4+}$ . Das mit  $[M-TPP+3H]^{3+}$  gekennzeichnete Ion ist das dreifach geladene unterivatisierte Molekül-Ion der B-Kette, das durch die Abspaltung von El-TPP entstanden ist ( $m/z$  289).

Das Spektrum zeigt ebenfalls den Verlust des Derivatisierungsreagenzes. Diese Fragmentierung lässt sich durch das Fragment-Ion El-TPP ( $m/z$  289) bzw.  $m/z$  1171) beweisen. Die Ladung ist auf dem Derivat lokalisiert. Dadurch entsteht als zweites Ion die unterivatisierte B-Kette des Rinder-

Insulins ( $m/z$  1171), welche drei Ladungen besitzt. Auffallend intensiv ist das Fragment  $m/z$  602.6 welches als  $y_3^+$ -Fragment das Derivat trägt (ebenso wie  $y_4^+$ ,  $y_5^+$ ,  $y_6^+$ ). Die Fragment-Ionen der b-Serie treten im dreifachen und zweifachen Ladungszustand auf und sind gegenüber der underivatisierten B-Kette nicht verändert, tragen also kein TPP-Derivat. Die *ipso*-b-Fragment-Ionenserie besteht nur aus einem Fragment-Ion ( $b_{30}^{4+}$ ).

Als dominantes dreifach ( $n-1$ -fach) geladenes Ion bildet sich  $b_{27}^{3+}$  aus, dass durch die Fragmentierung am Prolin (Thr-Pro) entstanden ist. Die  $b^{3+}$ -Fragment-Ionenserie geht bis  $b_2^{3+}$ . Ungewöhnlich intensiv sind die Ionen um den Glycinrest (normalerweise intensitätsschwach). Zweifach geladene Fragment-Ionen der b-Serie ( $b_{27}^{2+}$  -  $b_{11}^{2+}$ ) erweitern die Sequenzinformation über den mittleren Bereich des Peptids. Dadurch lässt sich mehr als 50 % der Peptidsequenz belegen.

Die Derivatisierung mit TPP ist zum Teil instabil. Durch den Fragmentierungsprozess zerfällt ein Teil der Ionen unter Eliminierung des Derivates (Bildung von EI-TPP,  $m/z$  289). Aus dem Molekül-Ion  $[M+2H]^{3+}$  findet eine ausschließliche Eliminierung des Derivates statt (5.4.6.1). Durch den erhöhten Protonierungsgrad des Molekül-Ions der derivatisierten B-Kette  $[M+5H]^{5+}$  ist die Eliminierung nun nicht mehr der ausschließliche Fragmentierungsweg des Peptids. Das Derivat ist an Lysin gekoppelt, was durch die  $y$ -Fragment-Ionen belegt ist. Es lassen sich keine underivatisierten  $y$ -Fragment-Ionen detektieren, da durch die Eliminierung des EI-TPP die Ladung nicht mehr auf dem  $y$ -Fragment verbleiben kann.

### 5.4.6.3 Fragmentierung des Mono-TPP-Derivats der B-Kette $[M+4H]^{5+}$

Das Spektrum zeigt als Basispeak das vierfach geladene  $b_{27}^{4+}$ -Fragment (ohne TPP). Die übrigen Ionen sind überwiegend zwei bis vierfach geladene b-Fragment-Ionenserien, die Sequenzinformationen über den C-terminalen Bereich und den Mittelteil der Peptidsequenz enthalten.

Aus dem Molekül-Ion  $[M+4H]^{5+}$  spaltet sich das Eliminierungsprodukt (EI-TPP) ( $m/z$  289.3) ab. Das korrespondierende Ion der underivatisierten B-Kette ( $m/z$  879), welches vier Ladungen besitzt, ist nicht so stark wie im vorhergehenden MS-Experiment (siehe 5.4.6.2). Das  $y_3^+$ -Fragment mit TPP belegt die Derivatisierung an Lysin. Bedingt durch die fünfte Ladung ist die Ausbildung eines zweifach geladenen  $y_3^{2+}$ -Fragmentes (ebenso  $y_4^{2+}$  TPP) ermöglicht. Somit lässt sich bei ausreichendem Protonierungsgrad eine zusätzliche Ladung an den C-Terminus dirigieren, obwohl dort schon durch das TPP eine feste Ladung etabliert ist. Für die Intensität des Eliminationsproduktes ist diese zusätzliche Ladung förderlich (Erhöhung von 17 % auf 32 % rel. Intensität).

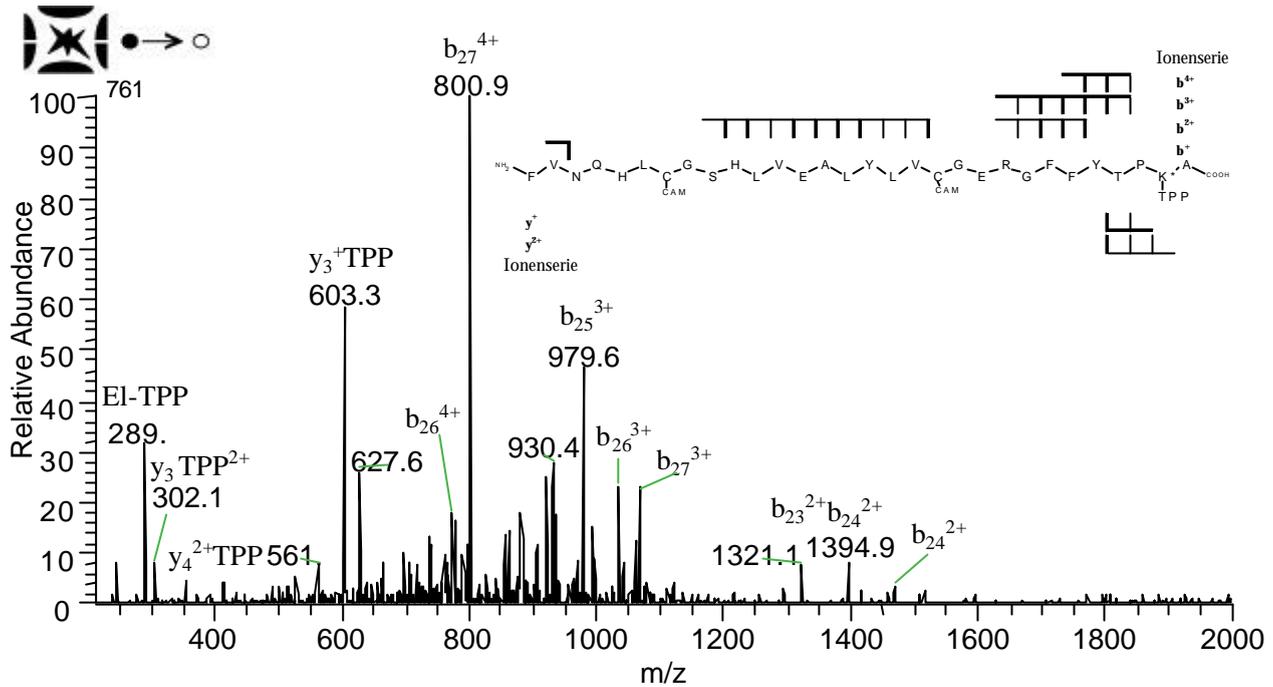


Abbildung 78: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Mono-TPP-Derivats der B-Kette  $[M+4H]^{5+}$ ; Das y<sub>3</sub>-Fragment kommt als einfach (m/z 603.3) und als zweifach (m/z 302.1) geladenes bn vor. Die zweifache Protonierung wird durch das TPP-Derivat verursacht.

Fragment-Ionenserien mit gleichem Ladungszustand lassen sich nicht detektieren. Die n-1 fach geladenen b-Fragmente (b<sub>25</sub><sup>4+</sup>, b<sub>26</sub><sup>4+</sup>, b<sub>27</sub><sup>4+</sup>) sind zwar intensiv, erbringen aber keine neuen Sequenzinformationen, da b<sub>27</sub> bedingt durch den Prolinbindungsbruch regelmäßig in verschiedenen Ladungszuständen (b<sub>27</sub><sup>4+</sup>, b<sub>27</sub><sup>3+</sup>) intensiv fragmentiert. Die dreifach geladenen b-Ionenfragmente (b<sub>27</sub><sup>4+</sup> bis b<sub>22</sub><sup>3+</sup>) und die zweifach geladenen b-Ionenfragmente (b<sub>25</sub><sup>2+</sup> bis b<sub>22</sub><sup>2+</sup> und b<sub>18</sub><sup>2+</sup> bis b<sub>12</sub><sup>2+</sup>) weisen eine Lücke in der Sequenz auf. Ionen, die durch Fragmentierung neben dem Arg 20 entstanden sind, fehlen bzw. haben Intensitäten nahe dem Rauschen. Bei einer „de novo“-Sequenzierung wären diese nicht zu identifizieren gewesen.

#### 5.4.6.4 Fragmentierung des Mono-TPP-Derivats der B-Kette $[M+5H]^{6+}$

In diesem Experiment wird von einem Ion ausgegangen, welches 6 Ladungen trägt. Der maximale Ladungszustand der underivatisierten B-Kette unter den gleichen Bedingungen beträgt 5 Ladungen.

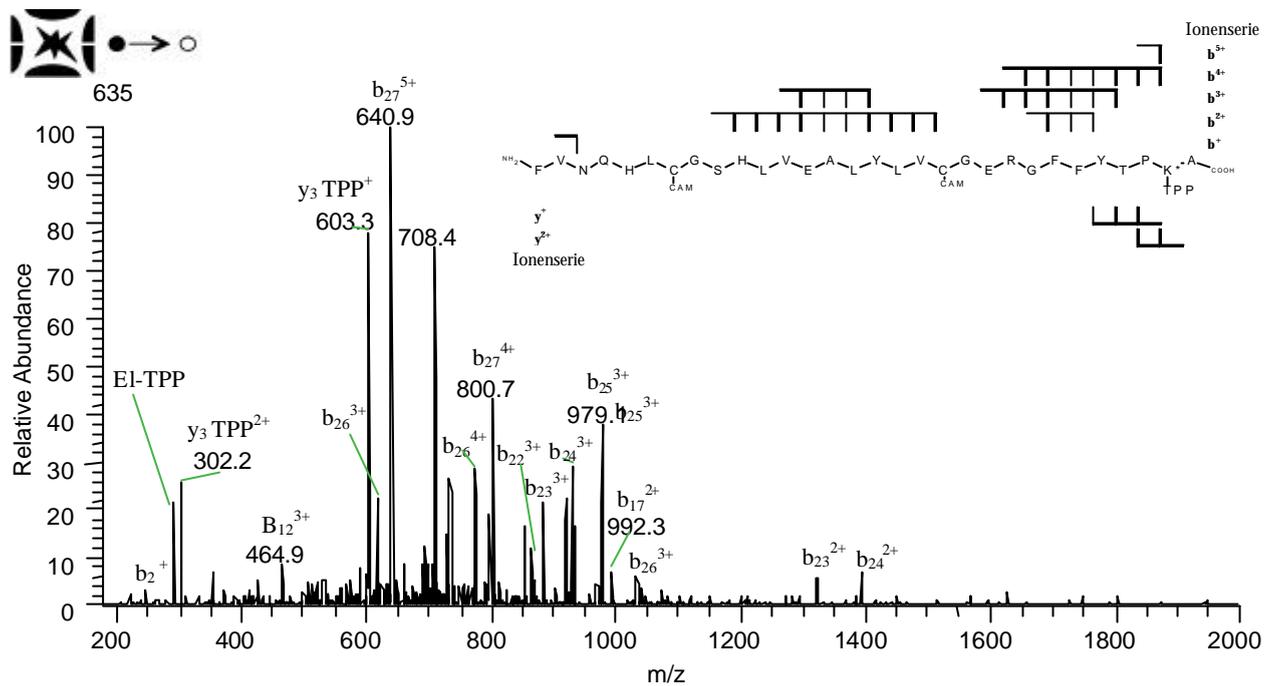


Abbildung 79: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Mono-TPP-Derivats der B-Kette  $[M+5H]^{6+}$ . Die relative Intensität des  $y_3$ -TPP-Fragmentes ( $m/z$  603.3 und  $m/z$  302.2) ist gegenüber dem Spektrum (Abbildung 78) stark erhöht.

Das Spektrum (siehe Abbildung 79) der Fragment-Ionenserie ähnelt im Wesentlichen dem des vorangegangenen MS-Experimentes (siehe Abbildung 78). Der Basispeak ( $b_{27}^{5+}$   $m/z$  641) ist durch den Bindungsbruch am Prolin entstanden (Thr-Pro). Die *ipso*-Ionenserie ist scheinbar nicht stabil, da lediglich  $b_{29}^{6+}$  ( $m/z$  616.9) auftritt. Die Ionenserie der vierfach geladenen b-Fragment-Ionen ab dem Prolinbindungsbruch ( $b_{27}^{4+}$  bis  $b_{22}^{4+}$ ) ist die intensivste Fragment-Ionenserie. Die vierfach geladenen Fragment-Ionen sind aus Vorläufer-Ionen entstanden, deren Protonierungsgrad um zwei Protonen höher war. Die Vermutung liegt nahe, dass diese Protonen nun auf den korrespondierenden y-Fragment-Ionen ( $y_3^{2+}$ ) stabilisiert oder übertragen worden sind. Tatsächlich lässt sich mit deutlicher Intensität das doppelt geladene  $y_3^{2+}$ -Fragment ( $m/z$  302.2) neben dem einfachen Ladungszustand des  $y_3^+$ -Fragmentes ( $m/z$  603.3) detektieren. Die Ionen der dreifach geladenen b-Serie ( $b_{26}^{3+}$  bis  $b_{22}^{3+}$  und  $b_{15}^{3+}$  bis  $b_{12}^{3+}$ ) führen die Fragmentierung fort. Die Lücke in der Sequenz ist vermutlich eine Auswirkung des Arg20, welches durch die stabilisierte Ladung in der Seitenkette eine Fragmentierung im Peptidrückgrat verhindert. Zweifach geladene b-Fragment-Ionen ( $b_{24}^{2+}$  bis  $b_{22}^{2+}$  und  $b_{18}^{2+}$  bis  $b_9^{2+}$ ) ergänzen die Sequenzinformation, auch wenn deren Identifizierung wegen der geringen Intensitäten schwierig ist.

### 5.4.7 Bis-TPP-Derivat der B-Kette des Rinder-Insulins

Die Vorläufer-Ionen sind schon im MS-Spektrum des Mono-Derivates enthalten (siehe 5.4.6). Da direkt injiziert wurde, konnten aus einer Lösung beide Spezies parallel untersucht werden. Folgende mehrfach geladene Ionenmassen wurden bestimmt: 1363, 1023, 818 und 682.

#### 5.4.7.1 Fragmentierung des Bis-TPP-Derivats der B-Kette $[M+H]^{3+}$

Das zweifach derivatisierte Ion mit drei Ladungen, von denen zwei Ladungen durch BrTPP auf das Peptid gebracht werden, zerfällt im MS<sup>2</sup>-Experiment in das Monoderivat. Dabei geht erwartungsgemäß eine Ladung verloren, so dass ein zweifach geladenes Monoderivat der B-Kette ( $m/z$  1900) entsteht. Das Ion El-TPP ( $m/z$  289) kann aufgrund des eingeschränkten  $m/z$ -Bereiches nicht detektiert werden.

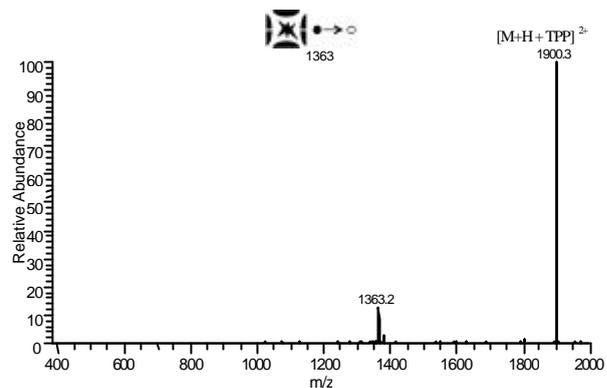


Abbildung 80: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Molekül-Ions  $[M+H]^{3+}$  des Bis-TPP-Derivats der B-Kette des Rinder-Insulins.

#### 5.4.7.2 Fragmentierung des Bis-TPP-Derivats der B-Kette $[M+2H]^{4+}$

Das vierfach geladene Ion verliert ebenfalls ein Molekül TPP und damit eine Ladung. Das Haupt-Fragment-Ion ist ( $m/z$  1267.7), aus dem ein Molekül TPP abgespalten worden ist. Als zweites Ion tritt das Molekül-Ion  $[M+2H]^{2+}$  der underivatisierten B-Kette des Rinder-Insulins auf ( $m/z$  1757.7). Dort sind zwei Moleküle des Derivats (El-TPP) eliminiert worden. Dies zeigt die Eliminierungsreaktion sowohl am N-Terminus als auch am Lysin stattgefunden hat.

Daneben treten mit schwacher Intensität noch b-Fragment-Ionen auf ( $b_{25}^{3+} - b_{27}^{3+}$  und  $b_{10}^{2+} - b_{15}^{2+}$ ). Eine Serie einfach geladener  $\gamma$ -Fragmente ( $\gamma_{13}^+$  bis  $\gamma_{17}^+$ ) dokumentiert den Verlust des Labels an Lysin (grau markierte Fragmentierungen in Abbildung 81). Kleinere Fragmente der  $\gamma$ -Serie treten als TPP-haltige Fragmente auf ( $\gamma_3^+ - \gamma_5^+$ ). Deren Intensität ist allerdings sehr gering. Ein Teil des Labels ist also vom Lysin eliminiert worden.

Es lassen sich keine b-Fragment-Ionen detektieren, die auf einen Verlust des N-terminalen TPP-Derivats hindeuten. Um auszuschließen, dass die niedrige Intensität der Fragment-Ionen eine Folge von nicht ausreichender Kollisionsenergie ist, wurde diese sukzessive erhöht. Bei 40% traten wenige Fragmente auf, bei 50% deutlich mehr. Deren relative Intensität war kleiner als 3 %.

Die Fragmentierungssituation stellt sich wie folgt dar. Der Verlust des Labels erfolgt bei zweifacher Derivatisierung (Lysin und N-Terminus) hauptsächlich am Lysin. Es entstehen einfach derivatisierte Molekül-Ionen der B-Kette ( $m/z$  1266.7), die wenige Ionen mit geringer Intensität liefern. Eine komplette Abspaltung der Derivate findet ebenfalls statt ( $m/z$  1757). Für diese beiden Reaktionen wird allerdings, die gesamte Kollisionsenergie benötigt, so dass keine interne Energie mehr für Fragmentierungen in der Peptidkette vorhanden ist.

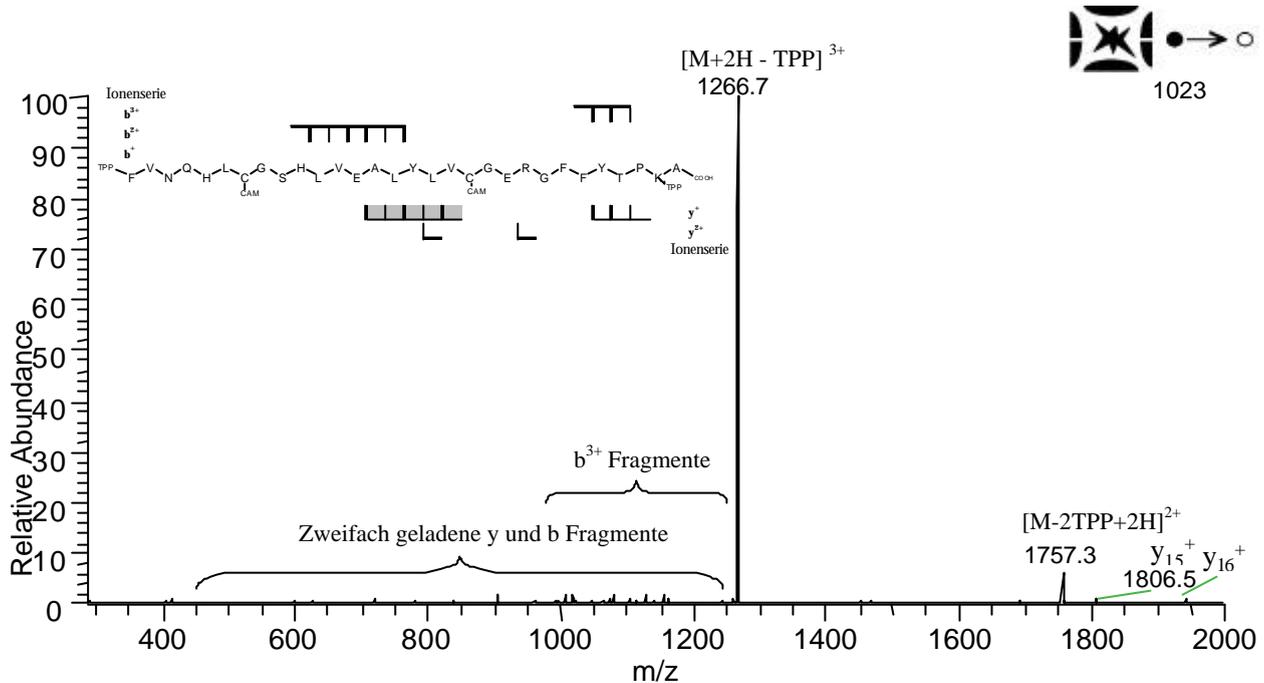


Abbildung 81: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Bis-TPP-Derivats der B-Kette  $[M+2H]^{4+}$ . Das dreifach geladene Molekül-Ion des Mono-TPP-Derivats der B-Kette ist der Basispeak ( $m/z$  1267.7).

### 5.4.7.3 Fragmentierung des Bis-TPP-Derivats der B-Kette $[M+3H]^{5+}$

Im Molekül-Ion  $[M+3H]^{5+}$  sind zwei Ladungen durch das TPP-Derivat eingebracht worden. Auch hier findet eine teilweise Abspaltung des TPP unter Verlust einer Ladung statt, so dass sich das vierfach geladene Molekül-Ion ( $m/z$  950.7 siehe Abbildung 82) des Mono-TPP-Derivates der B-Kette bildet. Die zweite über TPP eingeführte Ladung wird nicht abgespalten sondern verbleibt am N-Terminus.

Als Basispeak findet sich  $b_{27}^{4+}$  ( $m/z$  872), was dem Bindungsbruch an Prolin (Thr-Pro) entspricht. Der N-Terminus ist mit TPP derivatisiert. Das korrespondierende  $y$ -Fragment ( $y_3^+$ ) ist an Lysin ebenfalls mit TPP derivatisiert ( $m/z$  603.3, 50% relative Intensität, siehe Abbildung 82).

Die Abspaltung des Derivats findet statt, dokumentiert durch  $m/z$  289 für EI-TPP und durch das Mono-TPP-Derivat der B-Kette ( $m/z$  950.7). Die  $b^{4+}$ -Fragment-Ionenserie ( $b_{22}^{4+}$ -  $b_{30}^{4+}$ ) ausgehend von  $m/z$  950.7 und die dreifach geladene  $b$ -Ionenserie ( $b_{14}^{3+}$ -  $b_{27}^{3+}$ ) dokumentieren den Verbleib des N-terminalen TPP an der Peptidkette. Das intensive  $y_3$  TPP<sup>+</sup>-Fragment-Ion zeigt dagegen, dass das Derivat am Lysin stabil ist. Daneben gibt es noch eine intensitätsschwache zweifach geladene  $b$ -Ionenserie ( $b_{24}^{2+}$ -  $b_{27}^{2+}$  im Spektrum durch Klammern kenntlich gemacht), die kein TPP mehr enthält. Dies ist ein Indiz für die teilweise Instabilität des TPP-Derivats am N-Terminus.

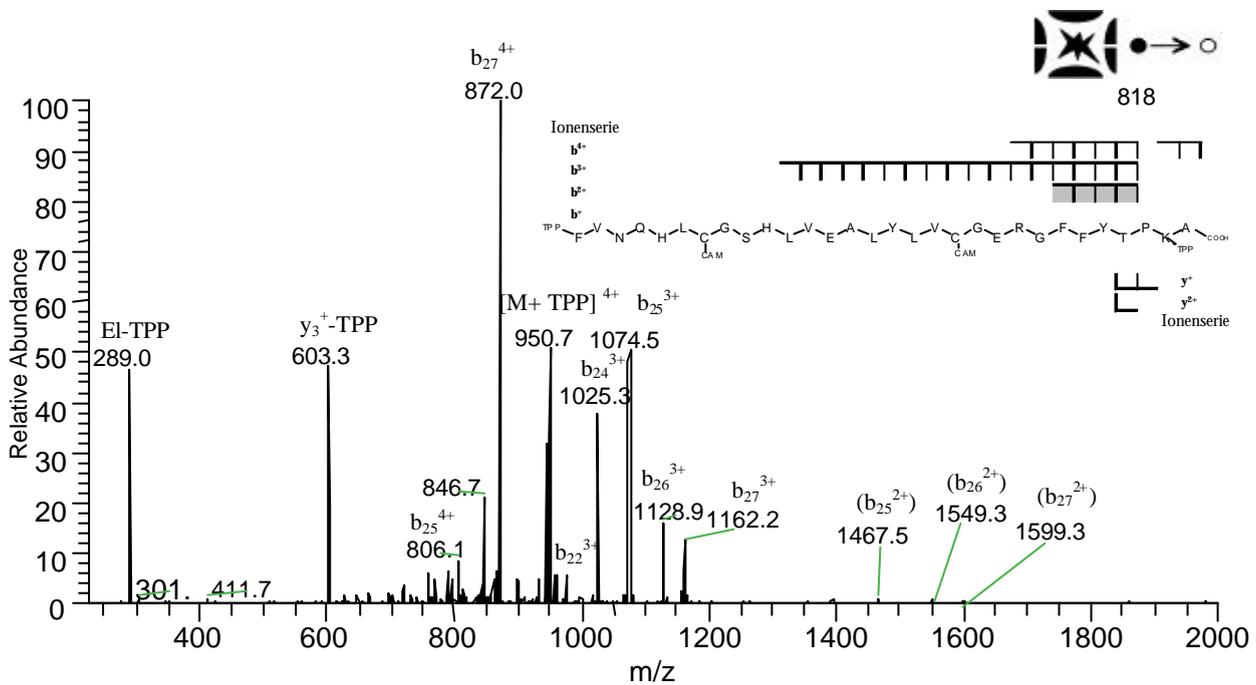


Abbildung 82: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Bis-TPP-Derivats der B-Kette  $[M+3H]^{5+}$ . Die grau unterlegten Fragmente sind die  $b$ -Fragmente, die kein TPP-Derivat am N-Terminus tragen. Im Spektrum sind diese Fragmente in Klammern gesetzt. Das Ion  $m/z$  950.7 ist das Mono-TPP-Derivat der B-Kette des Rinder-Insulins im vierfachen Ladungszustand, welches durch Eliminierung des Derivats (EI-TPP) entstanden ist.

#### 5.4.7.4 Fragmentierung des Bis-TPP-Derivats der B-Kette $[M+4H]^{6+}$

Durch die doppelte Derivatisierung mit TPP sind zwei der sechs Ladungen als fixierte Ladungen am N-Terminus und am Lysin eingebracht worden. Es findet eine Abspaltung des Derivats unter Ausbildung eines Ions der Masse 289 statt.

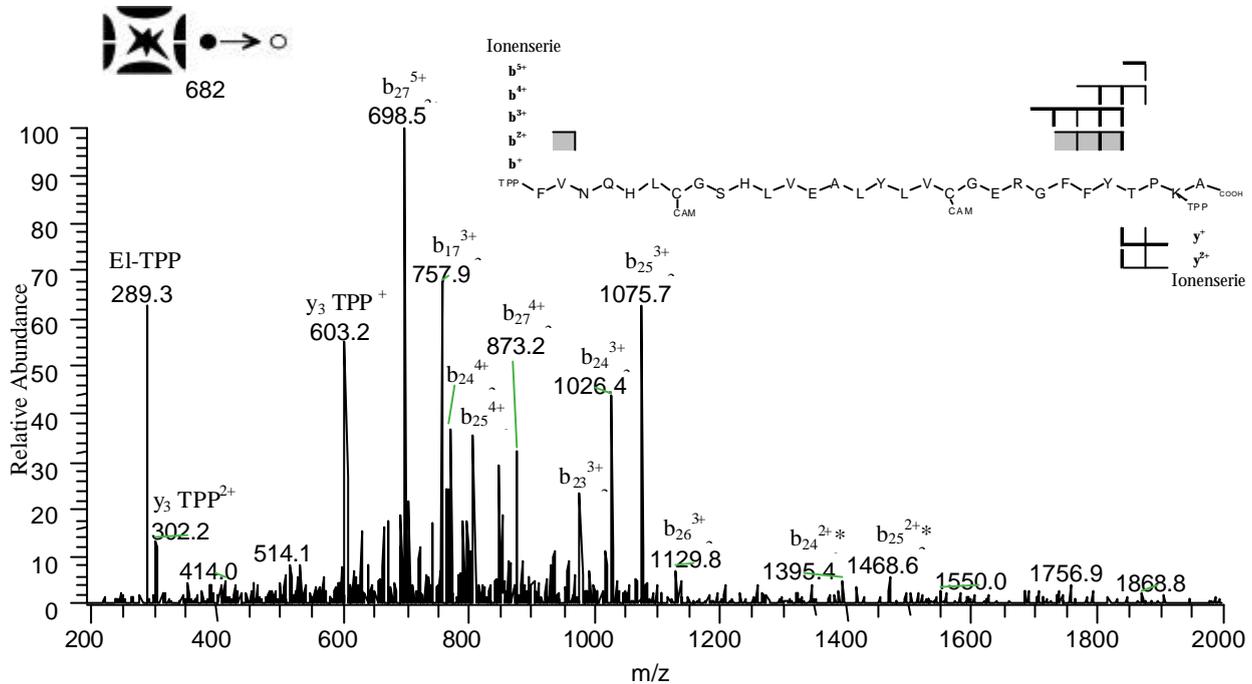


Abbildung 83: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Bis-TPP-Derivats der B-Kette  $[M+4H]^{6+}$ . Es lassen sich nur noch wenige b-Fragment-Ionen detektieren. Die grau schattierten Fragmente besitzen kein TPP-Derivat am N-Terminus mehr. Das Ion EI-TPP ( $m/z$  289) ist durch Eliminierung aus dem Bis-TPP-Derivat der B-Kette entstanden.

Der Basispeak ist das Prolinfragment  $b_{27}^{5+}$  (Bindungsbruch Thr-Pro). Das korrespondierende  $y_3^+$ -Fragment ( $m/z$  603.2) tritt ebenfalls deutlich intensiv auf. Weitere Fragmente der fünffach geladenen b-Ionenserie treten nicht auf. Statt dessen lassen sich eine Reihe von vierfach geladenen b-Fragment-Ionen ( $b_{27}^{4+}$  bis  $b_{25}^{4+}$ ) sowie die  $b^{3+}$ -Fragment-Ionenserie ( $b_{26}^{3+}$  bis  $b_{23}^{3+}$ ) bestimmen. Beide Ionenserien tragen am N-Terminus ein TPP-Derivat. Wie schon im vorigen Experiment, lassen sich noch einige zweifach geladene b-Fragmente mit schwacher Intensität detektieren (siehe Abbildung 83), die aber den N-terminalen TPP-Label verloren haben. Es lassen sich nur noch Fragmentierungen in der Nähe des C-Terminus detektieren.

Die beiden letzten Experimente sind untereinander schlüssig und zeigen, dass zuviel lokalisierte Ladung auf dem Protein die Fragmentierung nicht in der Weise vereinfacht, dass mehr Ionen entstehen. Im Gegenteil, durch die festen Ladungen entstehen nur noch b-Fragment-Ionen. Es gibt somit keine y-Fragmente mehr (oder nur bedingt durch das C-terminale Lysin) die das Spektrum verkomplizieren, aber es geht auch die Sequenz-Information über den N-Terminus verloren.

### 5.4.8 Einfluss der Alkylierung mit Brom-Triphenyl-Phosphin auf das Fragmentierungsverhalten der B-Kette des Rinder-Insulins

Die Fragment-Ionenintensitäten (siehe Abbildung 85) für die beiden Derivate und die unterschiedlichen Ladungszustände zeigen die Veränderungen durch die zusätzlichen Ladungsträger. Auffällig ist, dass die zusätzliche Ladung eigenen Fragmentierungen unterliegt. Bei geringen Ladungszuständen (+3 für das Mono-Derivat und +3 sowie +4 für das Bis-Derivat) zeigt sich die ausschließliche Eliminierungsreaktion des TPP. Erst mit zunehmender Ladungsdichte auf dem Peptid ist der Label stabil, und TPP-Fragment-Ionen können detektiert werden.

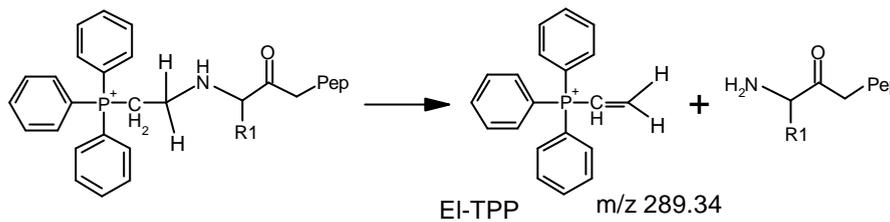


Abbildung 84: Schema der Eliminierungsreaktion und Bildung von  $m/z$  289

Für das Monoderivat ergeben sich aussagekräftige Spektren erst für den Ladungszustand +4. Gegenüber dem underivatisierten Peptid zeigt sich, dass die Fragmentierungen nur noch im C-terminalen Bereich stattfinden. Dabei entstehen vorwiegend b-Fragment-Ionen, sowie einige kleinere korrespondierende y-Fragment-Ionen. Für den Ladungszustand +5 (Monoderivat) zeigt sich ein ähnliches Fragmentierungsverhalten. Durch die fixierte Ladung am N-Terminus sind Bindungsbrüche des N-Terminus nicht mehr zu detektieren. Das mobile Proton ist scheinbar auf den C-terminalen Bereich ausgewichen bzw. durch die feste Ladung verdrängt worden. Für den zusätzlichen Ladungszustand +6 wird das Spektrum noch ärmer an Fragment-Ionen. Waren zuvor noch im mittleren Bereich des Peptids Fragmentierungen anzutreffen, so ist deren Intensität nun stark vermindert.

Für das Bis-Derivat sind Fragment-Ionen erst ab dem Ladungszustand +5 detektierbar (siehe Abbildung 86), obwohl auch im Ladungszustand +4 einige wenig intensive Fragmente (<2%) zu finden sind. Das Fragmentierungsverhalten ähnelt dem des Mono-Derivats. Es sind nur noch Fragmentierungen am C-Terminus zu beobachten. Gut zu sehen ist auch die Lücke in der Fragment-Ionenserie um die Aminosäure 19 bis 22. In der Sequenz finden sich die Aminosäuren --GERG--. Arginin als potentieller Ladungsträger ist direkt benachbart mit der sauren Aminosäure Glutamat. Beide werden flankiert von Glycinresten, die ebenfalls schwache Fragmentierungen liefern. Somit ist es nicht verwunderlich, dass die Intensitäten der Fragment-Ionenserien abnehmen. Trotz Derivatisierung konnte die durch die Sequenz beeinflusste intensitätsschwache Fragmentierung nicht verbessert werden.

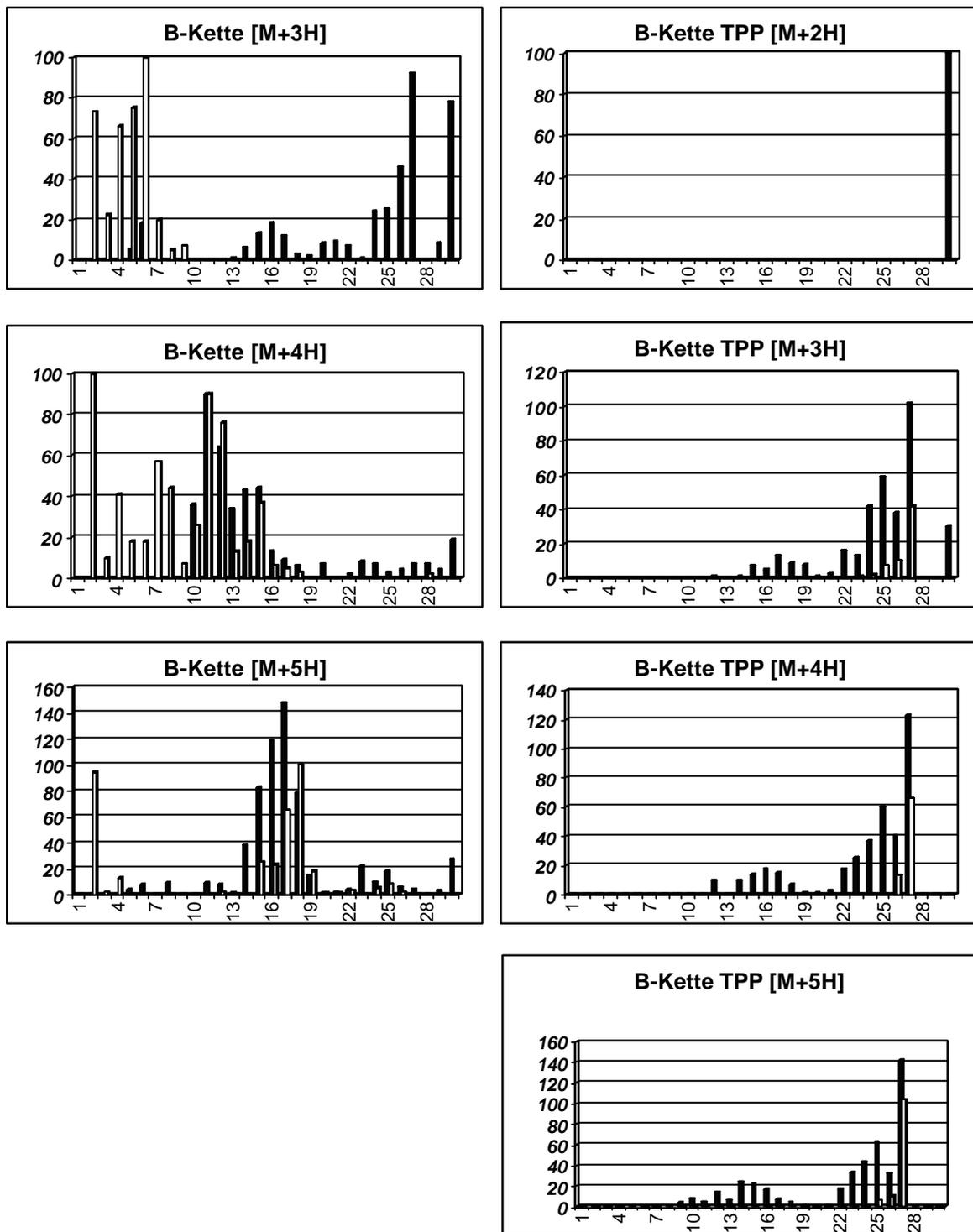


Abbildung 85: Fragment-Ionen-Intensitäten des Mono-Derivats der B-Kette des Rinder-Insulins; Relative Intensitäten größer 100% bedeuten, dass es mehrere Ladungszustände von den entsprechenden Fragment-Ionen gab.

Durch die Einführung von positiven Ladungen konnte die Fragmentierung auf den C-Terminus dirigiert werden. Im Vergleich zur underivatisierten B-Kette ( $m/z$  879) fällt auf, dass mehrfach geladene  $\gamma$ -Fragment-Ionen nicht mehr auftreten. Entgegen der Annahme, dass eine zusätzliche Ladung die Fragmentierung im N-terminalen Bereich verbessern könne, konnte dies unter ESI-MS Bedingungen für mehrfach geladene Vorläufer-Ionen nicht nachgewiesen werden. Somit hat sich das Spektrum vereinfacht, wobei nur Sequenzinformationen über den C-Terminus und die Mitte des

Peptids erhalten werden konnten. Allen Spektren gemeinsam ist das Loch in der Sequenz, welches durch Prolin entsteht. Das Ion  $b_{28}$  ist in keinem der Spektren zu detektieren.

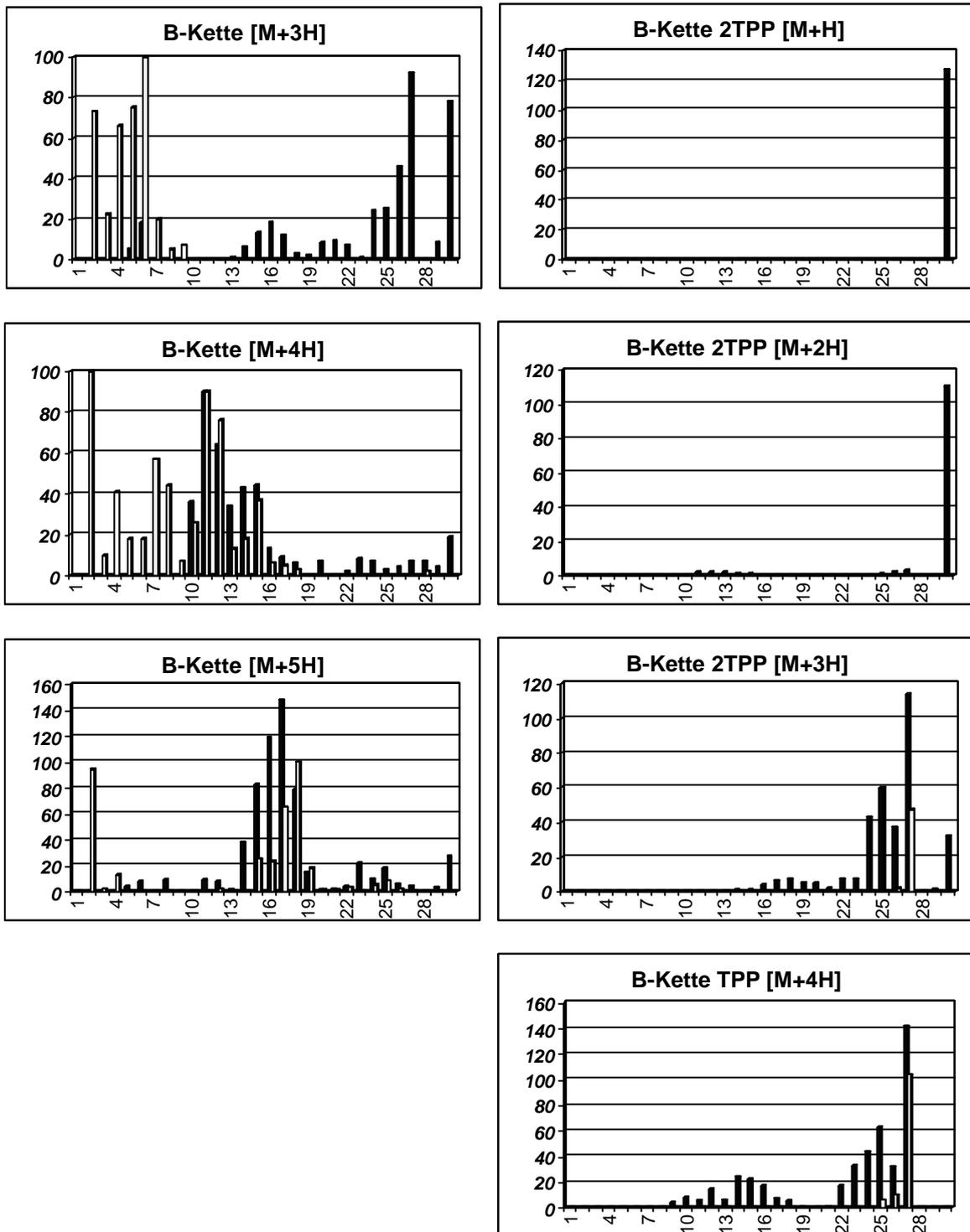


Abbildung 86: Vergleich der Fragment-Ionenintensitäten des Bis-Derivats der B-Kette und der underivatisierten B-Kette des Rinder-Insulins; Relative Intensitäten größer 100% bedeuten, dass es mehrere Ladungszustände der entsprechenden Fragment-Ionen gab.

### 5.4.9 Sulfonylierung mit Chlor-Sulfonylacetyl-Chlorid, CSAC der B-Kette des Rinder-Insulins

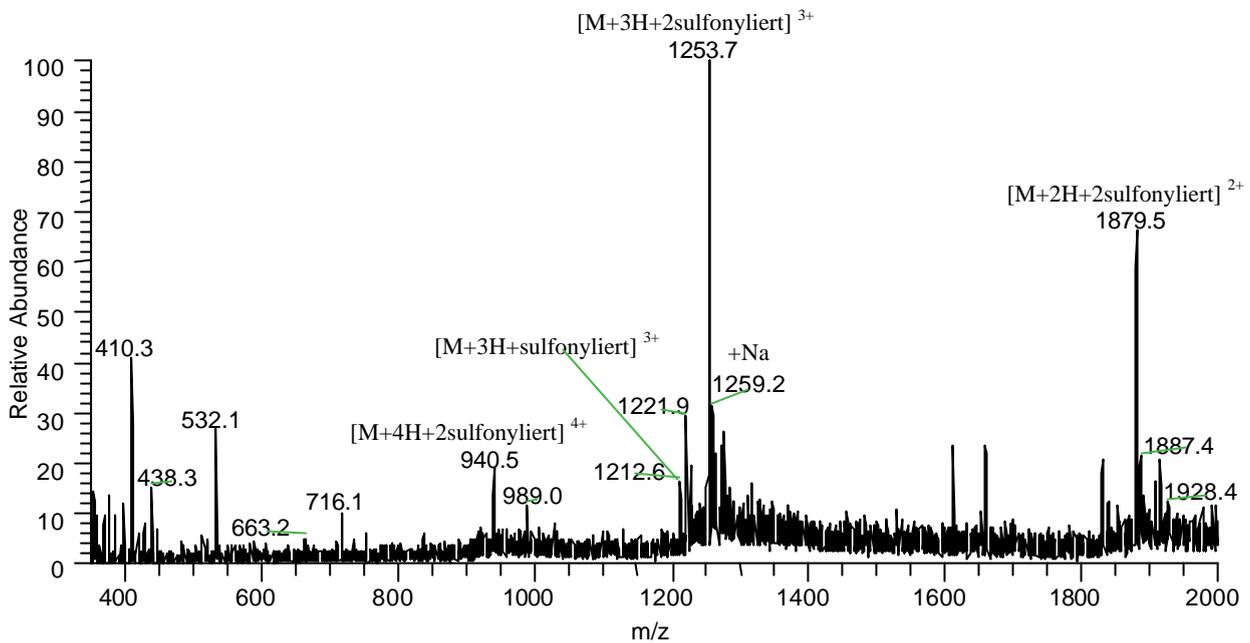


Abbildung 87: MS-Spektrum der zweifach sulfylierten B-Kette des Rinder-Insulins.

Das Spektrum zeigt als Hauptprodukt die zweifache Sulfonylierung der B-Kette des Rinder-Insulins mit den Ladungszuständen +2 (m/z 1879.5), +3 (m/z 1253.7) und +4 (m/z 940.1). Es werden noch Ionen detektiert, die auf eine einfache, unvollständige Derivatisierung als Nebenprodukt hindeuten. Hier konnte nur von den Ladungszuständen +2 (m/z 1818.5) und +3 (m/z 1212.6) ein Spektrum erhalten werden, die im Folgenden beschrieben werden.

Durch die zweifache Derivatisierung wird an beiden Enden des Peptids eine negative Ladung eingebracht, wodurch sich der Effekt des Derivats neutralisieren könnte.

## 5.4.10 Mono-Derivat der sulfonylierten B-Kette des Rinder-Insulins

### 5.4.10.1 Fragmentierung des Mono-sulfonylierten Derivats der B-Kette $[M+2H]^{2+}$ des Rinder-Insulins

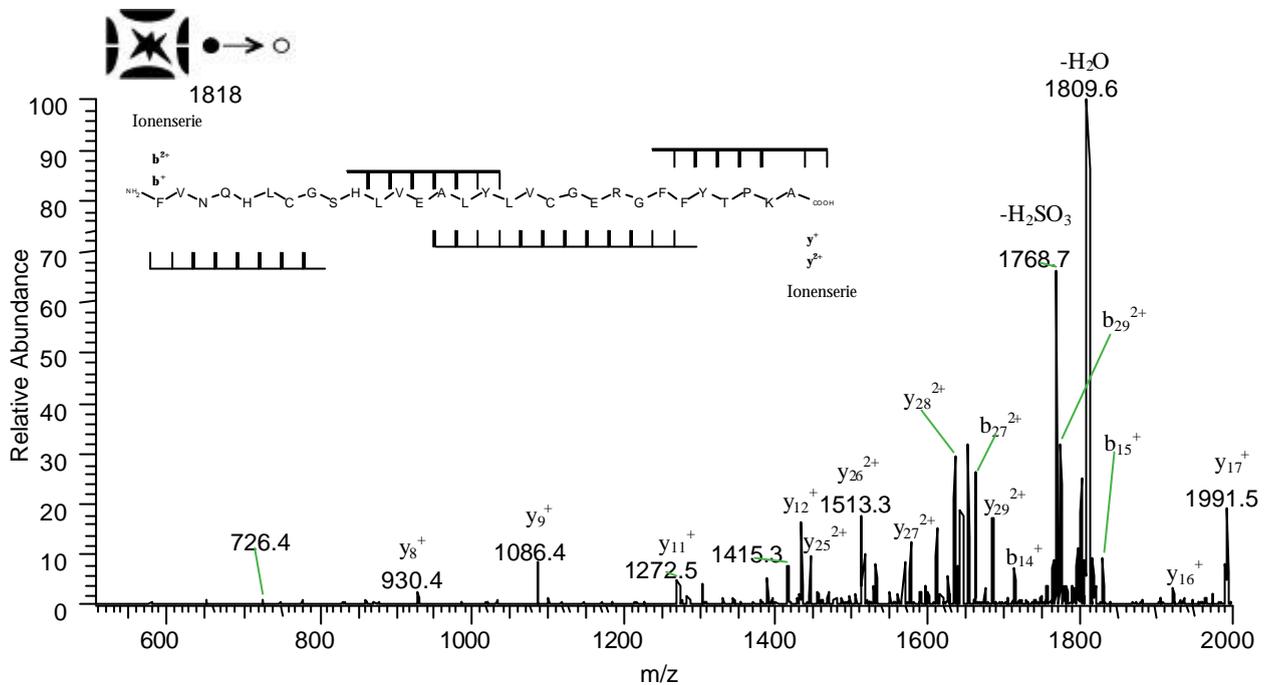


Abbildung 88: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Mono-Derivats der sulfonylierten B-Kette  $[M+2H]^{2+}$ .

Das Fragment-Ionenspektrum zeigt als Basispeak den Neutralverlust von Wasser ( $m/z$  1809.6). Ausgehend von  $b_{29}^{2+}$  lässt sich Ala als die C-terminale Aminosäure bestimmen. Erwartungsgemäß fehlt das Fragment-Ion neben Prolin (Pro-Lys), so dass die *ipso*-b-Ionenserie erst mit  $b_{27}^{2+}$  fortgesetzt werden kann. Nach dem Fragment  $b_{24}^{2+}$  bricht die Serie ab. Aufgrund der Masse der Fragment-Ionen kann erst wieder  $b_{16}^{+}$  als einfach geladenes Fragment-Ion detektiert werden. Kleinere b-Ionenfragmente treten bis  $b_3$  auf, wobei einige Lücken auffallen ( $b_9$ ,  $b_{12}$  und  $b_{13}$ ). Letztere sind aber wahrscheinlich von deutlich intensiveren y-Fragmenten überlagert, und deswegen nicht einwandfrei identifizierbar.

Die  $y^{2+}$ -Fragment-Ionenserie ist deutlich intensiver. Ausgehend vom Verlust des Sulfonsäure-Derivats ( $y_{30}^{2+}$ ) (Abspaltung des Derivats vom N-Terminus) kann die N-terminale Sequenz durch die zweifach geladenen y-Fragment-Ionen bis  $y_{23}^{2+}$  verfolgt werden. Somit können die ersten 7 Aminosäuren (FVNQHLC<sub>CAM</sub>) bestimmt werden (siehe Skizze in Abbildung 88). Die einfach geladenen y-Fragmente können aufgrund ihrer Größe erst ab  $y_{17}^{+}$  bis  $y_6^{+}$  detektiert werden. In der Sequenz -GER- kommt es zu der Konstellation, dass  $y_{10}^{+}$  nicht identifizierbar ist,  $y_9^{+}$  dagegen sehr intensiv auftritt. Im Spektrum der underivatisierten B-Kette des Rinder-Insulins fehlen diese intensiven  $b_{22}^{2+}$  und  $y_9^{+}$  Fragmente (entstanden durch Bindungsbruch Arg-Gly).

Das benachbarte Glutamat weist in der Seitenkette eine negative Ladung, durch die das mobile Proton des Peptidrückgrats für die intensive Fragment-Ionen-Bildung zur Verfügung steht, obwohl die positive Ladung des Arginins für gewöhnlich durch Coulombabstoßung eine Fragmentierung durch ein Proton auf dem Peptidrückgrat verhindert. Durch die Sulfonylierung hat sich die Verteilung der Protonen auf dem Peptidrückgrat verändert, so dass die durch die fixierte Ladung der Arginin-Seitenkette verhinderte Fragmentierung von Arg-Gly im sulfonylierten B-Ketten-Derivat stattfindet.

#### 5.4.10.2 Fragmentierung des Mono-sulfonylierten Derivats der B-Kette $[M+3H]^{3+}$ des Rinder-Insulins

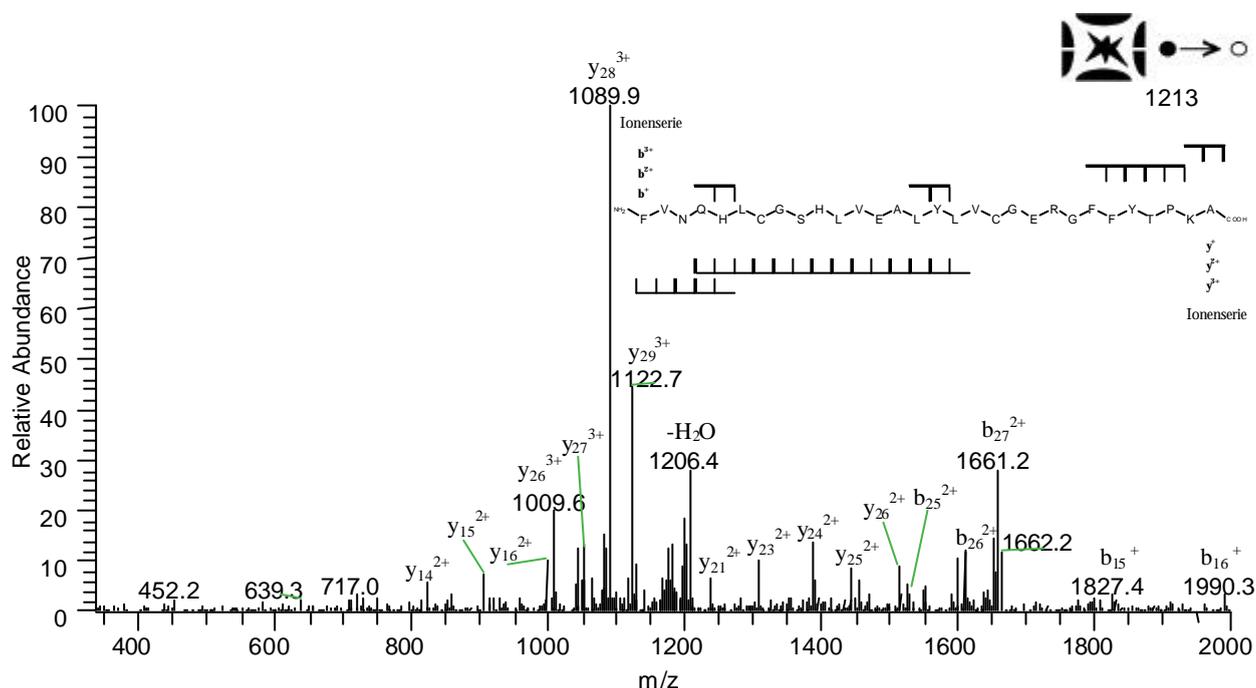


Abbildung 89: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Mono-Derivats der sulfonylierten B-Kette  $[M+3H]^{3+}$ .

Das Spektrum besteht aus einem hohen Anteil an y-Fragment-Ionen. Die *ipso*-Serie (y<sub>29</sub><sup>3+</sup> bis y<sub>26</sub><sup>3+</sup>) stellt gleichzeitig die Hauptfragmentierung und den Basispeak dar. Weitere dreifach geladene y-Fragment-Ionen werden nicht gebildet bzw. sind nicht in der Lage eine dritte Ladung zu tragen. Statt dessen wird die Charakterisierung des N-Terminus nahtlos mit der zweifachen y-Fragment-Ionenserie (y<sub>26</sub><sup>2+</sup> bis y<sub>14</sub><sup>2+</sup>) fortgesetzt. Als Protonierungsstelle für diese Fragmente kommt neben dem Lys 29 das Arg 22 in Frage.

Daneben lassen sich noch einzelne b-Fragment-Ionen detektieren. Aus den einzigen dreifach geladenen b-Fragment-Ionen (b<sub>30</sub><sup>3+</sup> und b<sub>29</sub><sup>3+</sup>) lässt sich nur das C-terminale Alanin bestimmen. Da weitere Fragment-Ionen nur als zweifach geladenen b-Fragment-Ionen (b<sub>27</sub><sup>2+</sup> bis b<sub>24</sub><sup>2+</sup>) auftreten, lässt sich die Sequenz bis zum Prolin belegen (siehe Skizze in Abbildung 89). Durch den

bevorzugten Prolin-Bindungsbruch (Thr-Pro) ist  $b_{27}^{2+}$  ( $m/z$  1661.2) gleichzeitig das intensivste b-Fragment des Spektrums. Da es nur im zweifachen Ladungszustand auftritt, liegt die Vermutung nahe, dass das dritte Proton am C-Terminus lokalisiert ist, auch wenn kleinere  $y$ -Fragmente nicht detektiert werden. Einfach geladene b-Fragmente sind  $b_5$ ,  $b_6$ , und  $b_{15}$ ,  $b_{16}$ . Weitere Fragment-Ionen sind nicht vorhanden.

#### 5.4.11 Einfluss der Mono-Sulfonylierung der B-Kette des Rinder-Insulins auf das Fragmentierungsverhalten

Es werden die Intensitäten der Fragment-Ionen verglichen, um die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des mobilen Protons oder strukturell bedingte Fragmentierungen zu erkennen. Dabei werden die Intensitäten der Fragment-Ionen verschiedener Ladungszuständen summiert.

Im Ladungszustand +2 ist durch die Sulfonylierung eine Intensivierung der Fragmentierungen im N-terminalen Bereich zu beobachten. Es entstehen  $y^{2+}$ -Fragment-Ionen durch Neutralverlust (es sind keine korrespondierenden b-Fragmente detektierbar).

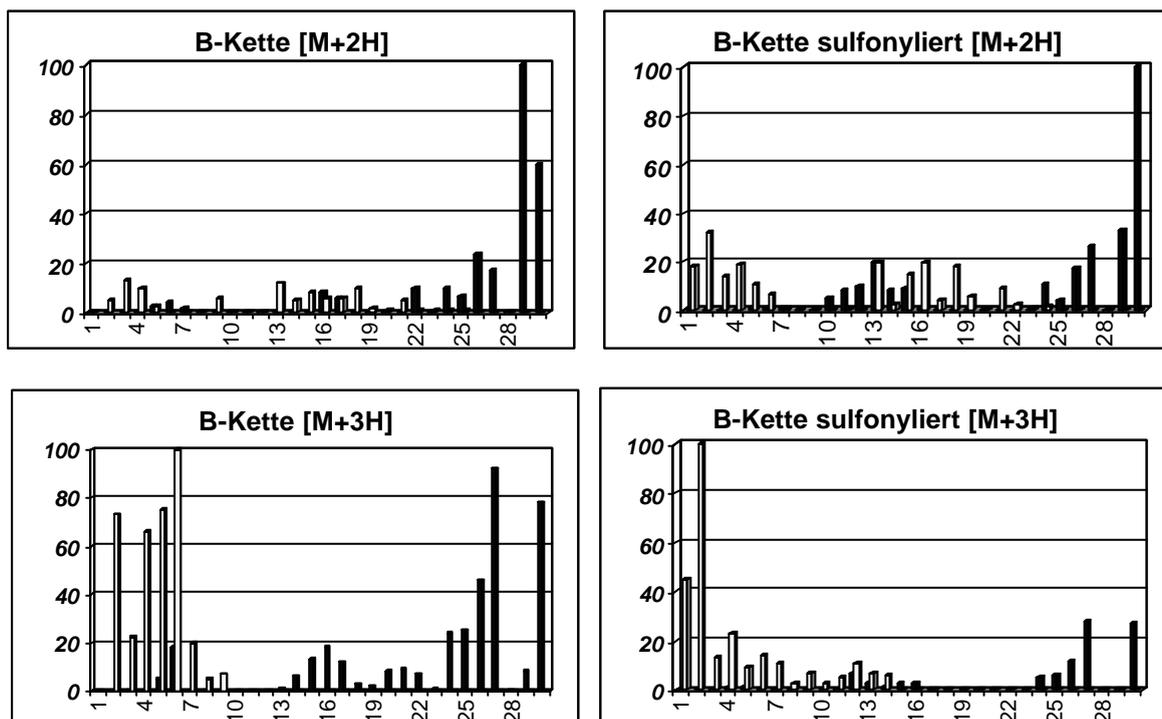


Abbildung 90: Vergleich der Fragment-Ionen-Intensitäten der unterivatisierten und der sulfonylierten B-Kette des Rinder-Insulins; helle Balken sind  $y$ -Fragmente, dunkle Balken sind b-Fragmente.

Im dreifachen Ladungszustand nehmen die Intensitäten der b-Fragmente durch die Derivatisierung ab (siehe Abbildung 90, unten). Es entstehen vorwiegend  $y^{2+}$ -Fragment-Ionen durch Bindungsbrüche im N-terminalen Bereich. Die Fragmentierungen traten teilweise schon im Spektrum der unterivatisierten B-Kette auf, werden aber durch die Sulfonylierung intensiviert. Kleinere

b-Fragment-Ionen fehlen, da vermutlich durch die Sulfonylierung keine Ladung am N-Terminus stabilisiert werden kann. Statt dessen ist das mobile Proton durch den *charge-site-induced* Mechanismus auf die  $\gamma$ -Fragmente übertragen worden. Im C-terminalen Bereich findet nur noch eine mäßige Fragmentierung statt (siehe Abbildung 90, unten rechts). Die mobilen Protonen besitzen für beide Ladungszustände eine größere Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der Umgebung des N-Terminus, weil die negative Ladung des Derivats das mobile Proton auf den N-Terminus „zieht“. Bei der Intensitätsverteilung des underivatisierten Peptids  $[M+3H]^{3+}$  fällt in der b-Serie die Lücke des Arg 22 auf, sowie die Lücke des His 10. Die in der underivatisierten B-Kette intensiven  $b^+$ -Fragment-Ionen ( $b_{13}^+$  bis  $b_{21}^{2+}$ ) sind nach Sulfonylierung nicht mehr detektierbar. Statt dessen ist die Serie der einfach geladenen  $\gamma$ -Fragment-Ionen intensiver geworden.

#### 5.4.12 Bis-Derivat der sulfonylierten B-Kette des Rinder-Insulins

Zwei negative Gruppen wurden eingeführt, eine am N-Terminus und eine am Lysin. Aus dem  $MS^1$ -Spektrum lassen sich drei Ladungszustände des Peptids detektieren ( $m/z$  1879.7  $[M+2H]^{2+}$ ,  $m/z$  1253.7  $[M+2H]^{3+}$  und  $m/z$  940.1  $[M+2H]^{4+}$ ). Ungewöhnlich ist, dass im einfach sulfonylierten B-Ketten-Derivat der Ladungszustand +4 nicht auftrat. Dies liegt vermutlich an den Ionisationsbedingungen in der ESI-Quelle.

##### 5.4.12.1 Fragmentierung des Bis-sulfonylierten Derivats der B-Kette $[M+2H]^{2+}$

Das Fragment-Ionenspektrum des zweifach geladenen Molekül-Ions zeigt als Basispeak das  $b_{27}^{2+}$ -Ion, das durch den Bindungsbruch am Prolin entsteht. Die *ipso*- $b^{2+}$ -Fragment-Ionenserie bricht nach  $b_{23}^{2+}$  ab. Dafür lassen sich einfach geladene Fragment-Ionen im erweiterten Massenbereich<sup>XVI</sup> detektieren (siehe Abbildung 92). Beginnend mit  $b_{24}^+$  lässt sich die Sequenz bis  $b_{12}^+$  ( $m/z$  1514.4) belegen. Die korrespondierenden  $\gamma$ -Fragmente tragen ausschließlich eine Ladung. Aufgrund der Größe der Fragmente muss ab dem  $\gamma_{16}^+$ -Fragment zur Detektion ebenfalls der erweiterte Massenbereich zur Bestimmung der Fragment-Ionen herangezogen werden.

Betrachtet man die Skizze in Abbildung 91 so ist eine Überlappung der einfach geladenen Fragment-Ionenserien festzustellen. Daneben ist auffällig der „Sprung“ der zweifach geladenen b-Ionenserie auf den einfachen Ladungszustand. Anzeichen für interne Fragment-Ionenserien lassen sich nicht finden.

---

<sup>XVI</sup> Bei ausreichender Fragment-Ionenintensität im Bereich über  $m/z$  2000 lassen sich noch einfach geladene Fragment-Ionen mit einer Masse größer als 2000 Da detektieren.

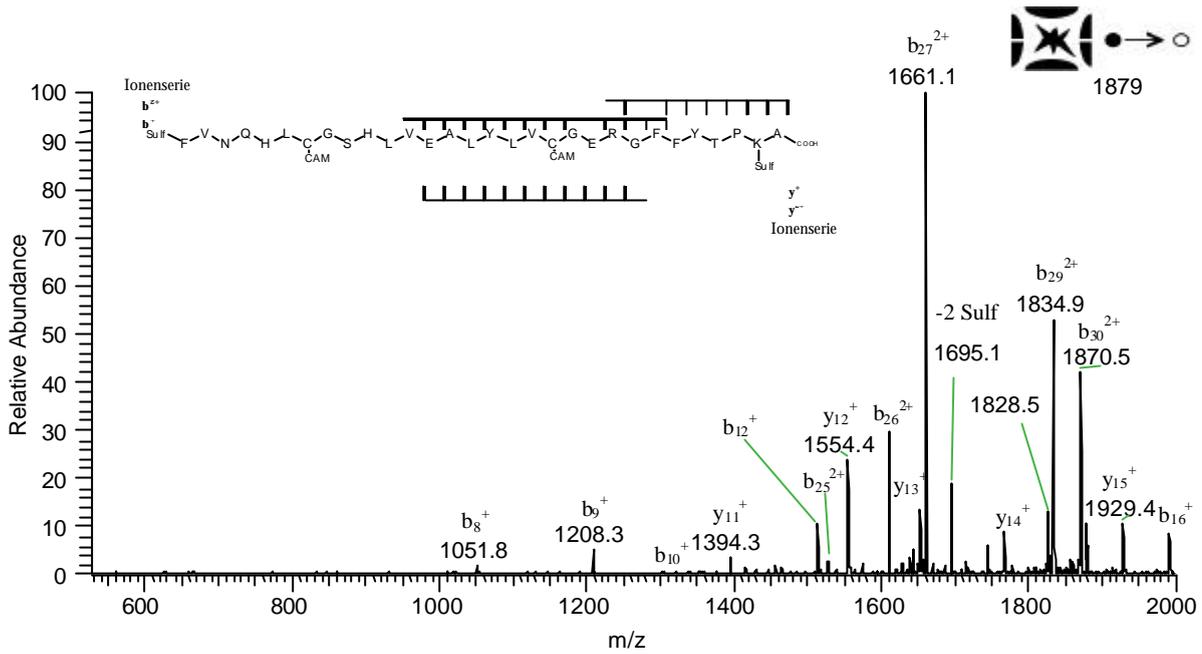


Abbildung 91: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Molekül-Ions  $[M+2H]^{2+}$  der zweifach sulfonylierten B-Kette.

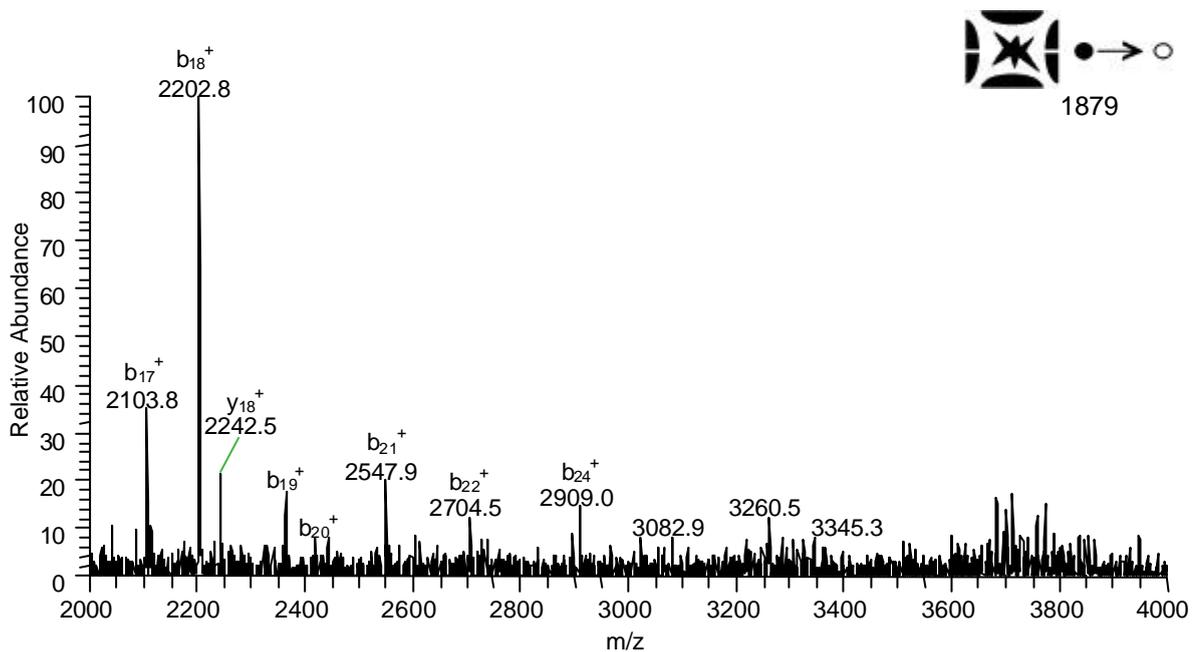


Abbildung 92: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Molekül-Ions  $[M+2H]^{2+}$  der zweifach sulfonylierten B-Kette im erweiterten Massenbereich (bis  $m/z$  4000).

### 5.4.12.2 Fragmentierung des Bis-sulfonylierten Derivats der B-Kette $[M+3H]^{3+}$

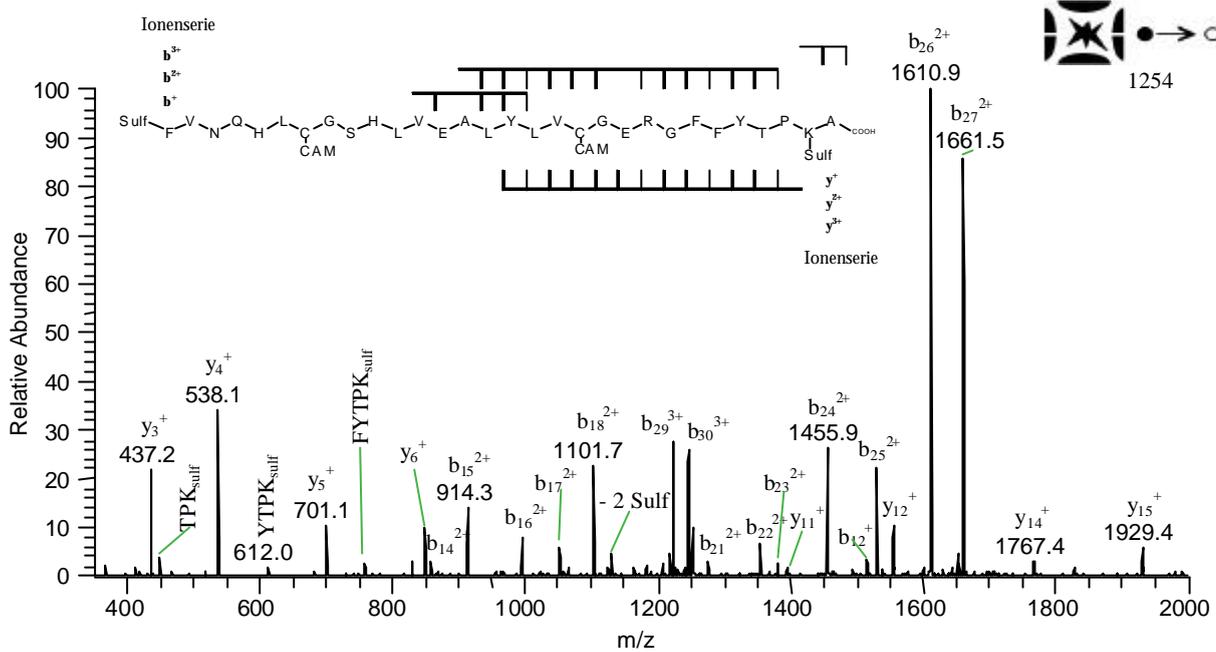


Abbildung 93: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Molekül-Ions  $[M+3H]^{3+}$  der zweifach sulfonylierten B-Kette.

Auffallend ist die starke y-Fragmentierung ( $y_3^+$  bis  $y_6^+$ ). Durch die Sulfonylierung am Lysin sind diese Fragment-Ionen ebenso wie bei der Einführung einer festen, positiven Ladung durch die Derivatisierung mit Brom-Ethyl-Triphenylphosphin (TPP) intensiv detektierbar. Durch die Einführung einer negativen Ladung wird hier die Fragmentierung nicht verhindert, indem positive Ladung neutralisiert wird, sondern die Fragmentierung der Ionen durch Neuverteilung der mobilen Protonen auf dem Peptid intensiviert.

Die zweifach geladenen korrespondierenden  $b^{2+}$ -Fragment-Ionen ( $b_{27}^{2+}$  bis  $b_{24}^{2+}$ ) sind ebenfalls intensiv ( $b_{26}^{2+}$  ist der Basispeak des Spektrums, siehe Abbildung 93). Die Serie der  $y^+$ -Fragment-Ionen setzt sich bis  $y_{15}^+$  fort.

Es lässt sich eine innere Fragment-Ionenserie ( $TPK_{sulf}$  449,  $YTPK_{sulf}$  612,  $FYTPK_{sulf}$  759,  $GFFYTPK_{sulf}$  961) detektieren, die aus y-Fragmenten bestehen, die C-terminal Alanin und Wasser ( $\Delta m = 89$ ) verloren haben. Die Ionen dieser Serie finden sich ebenfalls im Spektrum des vierfach geladenen Molekül-Ions (siehe 5.4.12.3).

### 5.4.12.3 Fragmentierung des Bis-sulfonylierten Derivats der B-Kette $[M+4H]^{4+}$

Das Spektrum wird durch hochgeladene b-Ionenfragmente bestimmt. Der C-Terminus zeigt intensive  $b_{29}^{4+}$ - und  $b_{30}^{4+}$ -Fragmente. Die n-1 fach geladene b-Fragment-Ionenserie beginnt bei  $b_{27}^{3+}$  (Bindungsbruch<sup>XVII</sup> Thr-Pro) und geht ebenso wie die zweifach geladene b-Fragment-Ionenserie bis  $b_{23}^{2+}$ . Ungewöhnlich ist, dass die zweifach und dreifach geladenen Fragment-Ionenserien die gleiche Sequenzinformation abdecken. Normalerweise wird die Sequenz durch die zweifach geladenen Fragmente fortgeführt. Erneut wird die Bildung der internen Fragment-Ionenserie (TPK<sub>sulf</sub> 449, YTPK<sub>sulf</sub> 612, FYTPK<sub>sulf</sub> 759, GFFYTPK<sub>sulf</sub> 961) beobachtet.

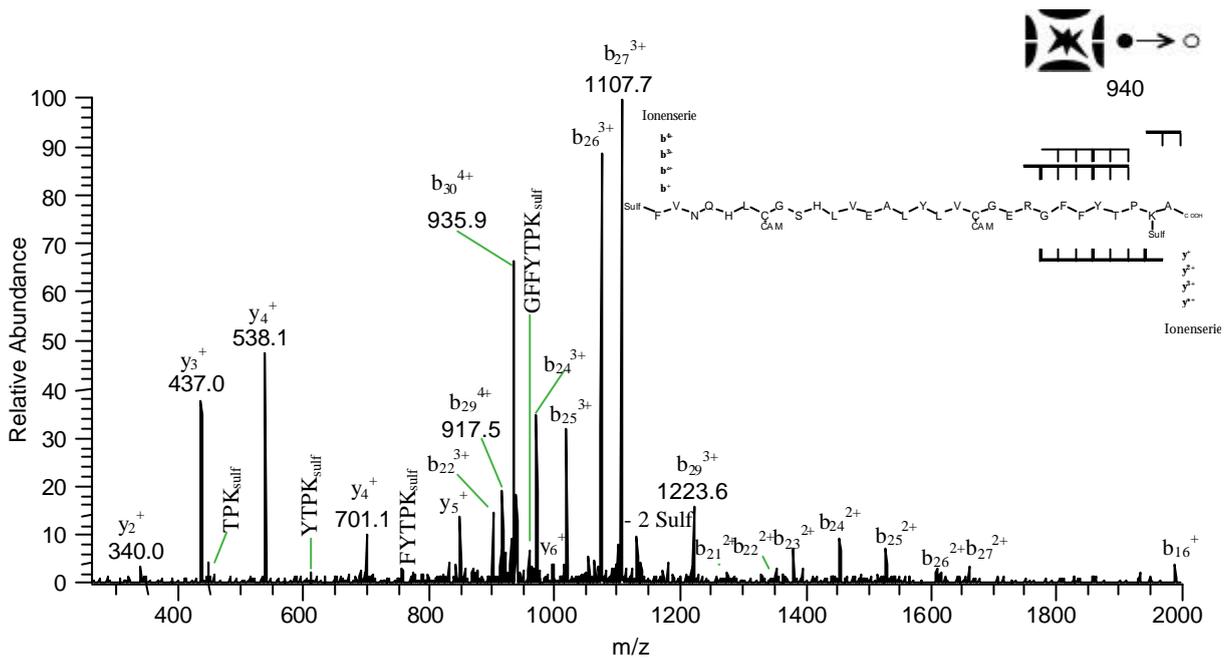


Abbildung 94: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Molekül-Ions  $[M+4H]^{4+}$  der zweifach sulfonylierten B-Kette.

Die y-Fragment-Ionenserie belegt den C-Terminus inklusive des Prolins ( $y_2^+$ -Fragment). Obwohl an den kleinen y-Fragmenten eine negative Ladung lokalisiert ist, treten einfach geladene Fragment-Ionen auf. Nach der Einführung einer negativen Ladung am N-Terminus, lassen sich dort aber keine b-Fragment-Ionen detektieren, die Informationen über den N-Terminus erhalten. Es finden ausschließlich Fragmentierungen am C-Terminus statt (siehe Skizze in Abbildung 94).

<sup>XVII</sup> Das  $b_{28}^{3+}$ -Fragment ist wenig intensiv, da die C-terminale Bindung von Pro (hier Pro-Lys) stabiler ist.

### 5.4.13 Einfluss der Bis-Sulfonylierung auf das Fragmentierungsverhalten der B-Kette des Rinder-Insulins

Durch die zweifache Derivatisierung sind an beiden Enden des Peptids negative Gruppen eingeführt worden, deren Ladung sich auf das Fragmentierungsverhalten auswirkt. Der Vergleich des

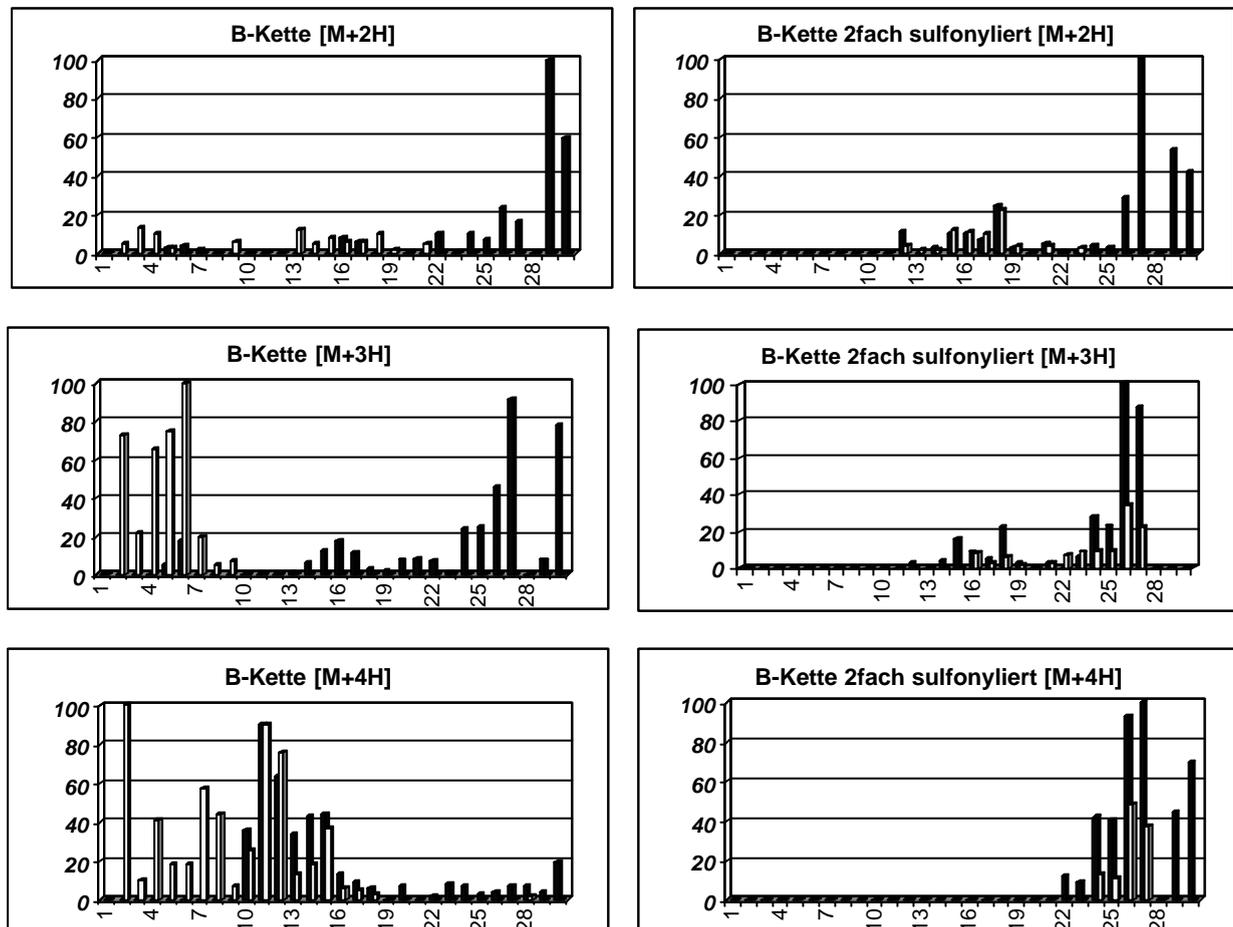


Abbildung 95: Fragment-Ionen-Intensitäten der unterivatisierten B-Kette (links) und der zweifach sulfonylierten B-Kette (rechts).

Fragmentierungsverhaltens der zweifach sulfonylierten zur unterivatisierten B-Kette des Rinder-Insulins zeigt, dass im vierfachen Ladungszustand eine Verschiebung der intensiven Fragmentierungen vom N-terminalen Bereich auf den C-Terminus stattfindet (siehe Abbildung 95, unten). Dabei entstehen unter Ladungstrennung mehrfach geladene b-Fragment-Ionen und einfach geladene y-Fragmente.

Ähnlich ist die Tendenz beim dreifachen Ladungszustand, wo nach Derivatisierung Fragmentierungen in der Mitte des Peptids beobachtet werden. Die Hauptfragmentierungen finden aber am C-Terminus statt. Mehrfach geladene y-Fragment-Ionen im N-terminalen Bereich treten nicht mehr auf.

Für den zweifachen Ladungszustand sind Fragmentierungen im mittleren Bereich der Peptidkette zu detektieren (siehe Abbildung 95, rechts oben). Gegenüber der underivatisierten B-Kette fehlen auch hier die Fragmentierungen im N-terminalen Bereich.

Die doppelte Derivatisierung hat den Effekt der Sulfonylierung des N-Terminus (mehr  $\gamma$ -Fragmente am N-Terminus) wieder rückgängig gemacht. Das oder die mobilen Protonen werden durch die zusätzliche Sulfonylierung am Lysin verstärkt auf den C-Terminus gezogen. Zusätzlich wird durch den vierfachen Ladungszustand eine Protonierung der beiden Histidine und des Arginins erreicht, die eine erhöhte Aufenthaltswahrscheinlichkeit für das vierte Proton im C-terminalen Bereich bewirken. Folglich entstehen im Ladungszustand +4 (siehe Abbildung 95, rechts unten) nur b-Fragment-Ionen durch Bindungsbruch im C-terminalen Bereich der B-Kette.

## 5.5 Glucagon

Glucagon ist ein 29 Aminosäuren langes lineares Peptidhormon, das in den  $\alpha$ -Zellen des Pankreas sezerniert wird. Als Antagonist des Insulins bewirkt es eine Senkung des Blutzuckerspiegels und eine Stimulierung der Glycogenolyse sowie der Gluconeogenese<sup>125</sup>. Glucagon besitzt neben dem N-Terminus vier weitere Protonierungsstellen (His, Lys, 2Arg). Durch die unmittelbare Nachbarschaft von N-Terminus und Histidin sowie der beiden Arginine ist eine zweifache Protonierung an diesen Stellen durch Coulombkräfte unwahrscheinlich (siehe Abbildung 96). Nach den Beobachtungen bei Angiotensin I sollten die Aspartat-Reste einen Einfluss auf das Fragmentierungsverhalten des Glucagons ausüben.

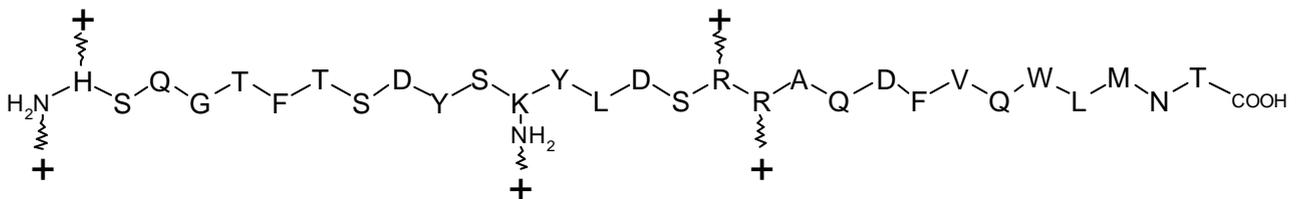


Abbildung 96: Aminosäuresequenz des Glucagons; die mit + gekennzeichneten Stellen sind Orte potentieller Ladungslokalisierung.

Glucagon besitzt im Gegensatz zur B-Kette des Rinder-Insulins kein Prolin. Das Lysin liegt als basische Aminosäure (Reaktionszentrum) in der Mitte des Peptids.

### 5.5.1 MS-Spektrum des underivatisierten Glucagons

Das underivatisierte Glucagon zeigt im ESI-MS-Spektrum drei Molekül-Ionen mit Ladungszuständen von +2 bis +4. Höhere Ladungszustände werden nicht detektiert, obwohl fünf basische Zentren vorhanden sind (N-Terminus, His, Lys, Arg, Arg). Das Ion  $m/z$  1393.7 ist ein Cluster-Ion, das durch Dimerisierung zweier Glucagonmoleküle entstanden ist. Es trägt fünf Ladungen und zerfällt durch Niederenergie-Stoßaktivierung in zwei-

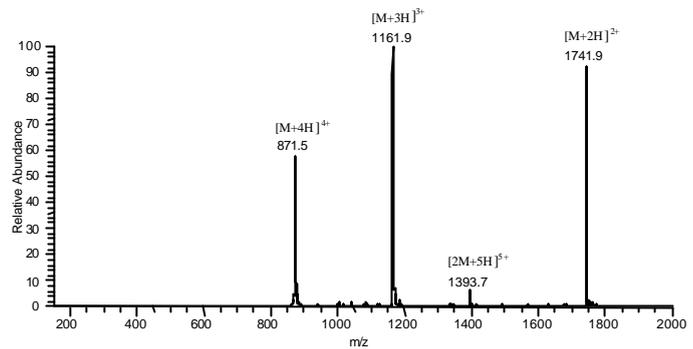


Abbildung 97: ESI-MS-Spektrum des underivatisierten Glucagons. Es entstehen mehrfach geladene Ionen. Das Ion  $m/z$  1393.7 ist ein Dimer von Glucagon, das fünffach geladen ist.

fach und dreifach geladene Molekül-Ionen, ohne dabei weiter zu fragmentieren (Spektrum nicht gezeigt).

#### 5.5.1.1 Fragmentierung des Molekül-Ions $[M+2H]^{2+}$ von Glucagon

Der Basispeak ist das Fragment  $y_{14}^+$  ( $m/z$  1752.4). Das Fragment ist durch einen Bindungsbruch neben Aspartat entstanden, bei dem eine Ladung auf der C-terminalen Seite verblieben ist. Das korrespondierende  $b_{15}^+$ -Fragment ist vermutlich aufgrund der Einstrahlbedingungen des Vorläufer-Ions nicht zu detektieren, da es die gleiche Masse wie das Ion  $[M+2H-H_2O]^{2+}$  ( $m/z$  1733) besitzt. Als weitere intensive Fragmente lassen sich  $b_9^+$  ( $m/z$  961.3),  $b_{21}^{2+}$  ( $m/z$  1223.0),  $y_8^+$  ( $m/z$  1038.3) und  $y_{20}^{2+}$  ( $m/z$  1223.0) detektieren. Alle Ionen sind durch einen Bindungsbruch C-terminal zu Aspartat entstanden (siehe Skizze in Abbildung 98). Dieser bevorzugte Bindungsbruch wurde auch schon bei der Fragmentierung von Angiotensin I (siehe 5.1.1.1) beobachtet. Da der Mechanismus für diese Fragmentierung durch Protonenübertragung der Carboxylat-Gruppe der Aspartat-Seitenkette eingeleitet wird und somit unabhängig von einer Protonierung der Peptidkette ist, lassen sich aus den Ladungszuständen der Fragment-Ionen Rückschlüsse auf deren Protonierungsgrad ziehen.

Die Ladungszustände der zweifach geladenen Fragment-Ionen  $b_{21}^{2+}$  und  $y_{20}^{2+}$  geben Hinweise auf die Ladungslokalisation im Molekül. Beide Fragment-Ionen enthalten als basische Aminosäuren Lysin und zwei Arginine; das  $b_{21}^{2+}$ -Fragment-Ion besitzt zusätzlich den N-Terminus und Histidin als basische Zentren. Eine zweifache Protonierung der benachbarten Arginine (Arg17 und Arg18) ist aufgrund der Coulomb-Abstoßung der Protonen unwahrscheinlich. Dies wird durch den einfachen Ladungszustand des  $y_{14}^+$ -Fragmentes bestätigt ( $m/z$  1752). Als zweiter Ort für die Protonierung im  $y_{20}^{2+}$ -Fragment kommt nur das Lys in Position 12 in Frage.

Für das Fragment-Ion  $b_{21}^{2+}$  ist die Ladungssituation aufgrund des fehlenden  $b_{15}$ -Fragmentes nicht eindeutig zu klären. Das Auftreten eines  $b_8^+$ -Fragments zeigt, dass eine Ladung am N-Terminus (oder am Histidin) lokalisiert ist. Die zweite Ladung ist vermutlich an einem der beiden Arginine lokalisiert, da Arginin gegenüber dem Lysin eine höhere Basizität besitzt.

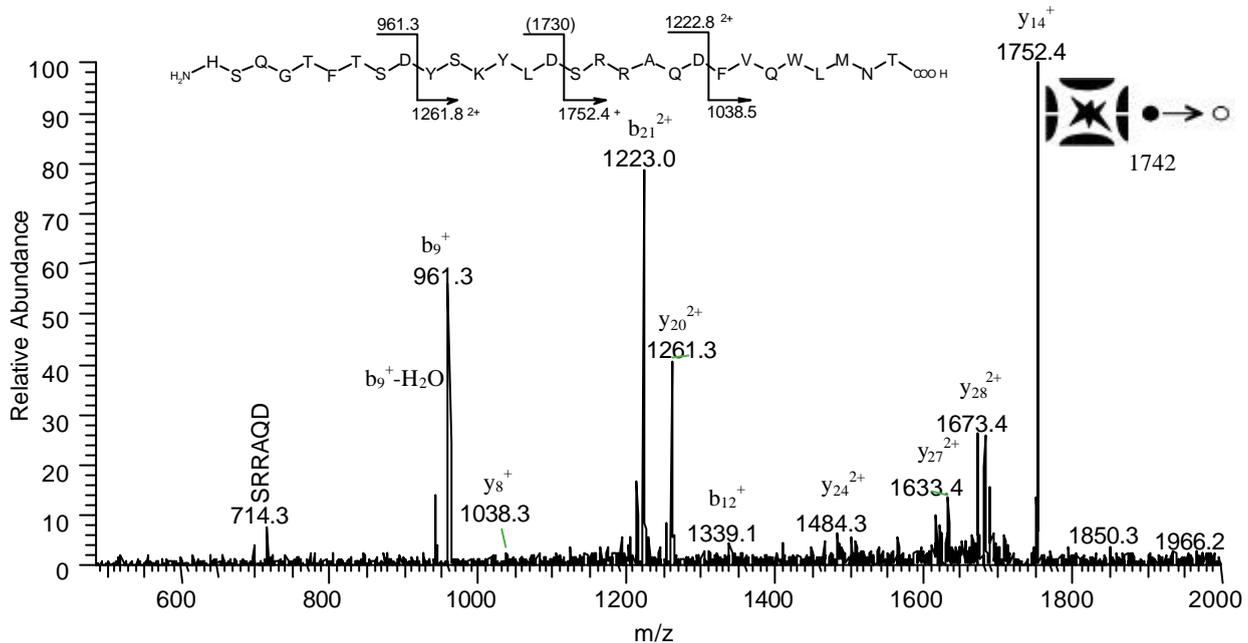


Abbildung 98: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des unterivatisierten Glucagons  $[M+2H]^{2+}$ ; Das Spektrum zeigt die Fragment-Ionen die durch Bindungsbruch C-terminal zu Aspartat entstanden sind. Der m/z-Bereich bis 1700 ist zehnfach vergrößert dargestellt.

Das  $y_{20}^{2+}$ -Fragment im Zusammenhang mit dem Auftreten des  $b_9^+$ -Fragments zeigt, dass nicht von einer strengen Ladungslokalisierung (fixierte Ladungen) ausgegangen werden kann. Wären die Ladungen streng lokalisiert, so dürften diese beiden Fragmente nicht auftreten, da nur ein zweifach geladenes Molekül-Ion fragmentiert. Dieser Befund bedeutet aber, dass im Molekül ein Protonen-Austausch zwischen den basischen Zentren stattfindet oder das Molekül-Ion aus verschiedenen Ladungskonformeren<sup>XVIII</sup> besteht.

Analoge Betrachtungen lassen sich für  $b_{21}^{2+}$  und  $y_8^+$  aufstellen. Die verminderte Intensität des  $y_8^+$ -Fragment-Ion lässt allerdings vermuten, dass nur eine geringe Ladungsdichte auf dem C-terminalen Fragment vorhanden ist. Statt dessen sind die Ladungen an Lysin und Arginin fixiert und es entsteht ausschließlich das  $y_{20}^{2+}$ -Fragment.

### 5.5.1.2 Fragmentierung des Molekül-Ions $[M+3H]^{3+}$ von Glucagon

Aus dem dreifach geladenen Precursor-Ion ergibt sich nach Justierung der Kollisionsenergie  $y_{20}^{2+}$  (m/z 1261) als Basispeak des Fragment-Ionenspektrums. Die übrigen Ionen, die durch

<sup>XVIII</sup> Moleküle mit unterschiedlichen Protonierungsstellen.

Aspartat-Bindungsbrüchen entstanden sind, werden ebenfalls detektiert; nur haben sich hier Ladungszustand und Intensität der Fragmente gegenüber dem MS<sup>2</sup>-Spektrum von [M+2H]<sup>2+</sup> verändert.

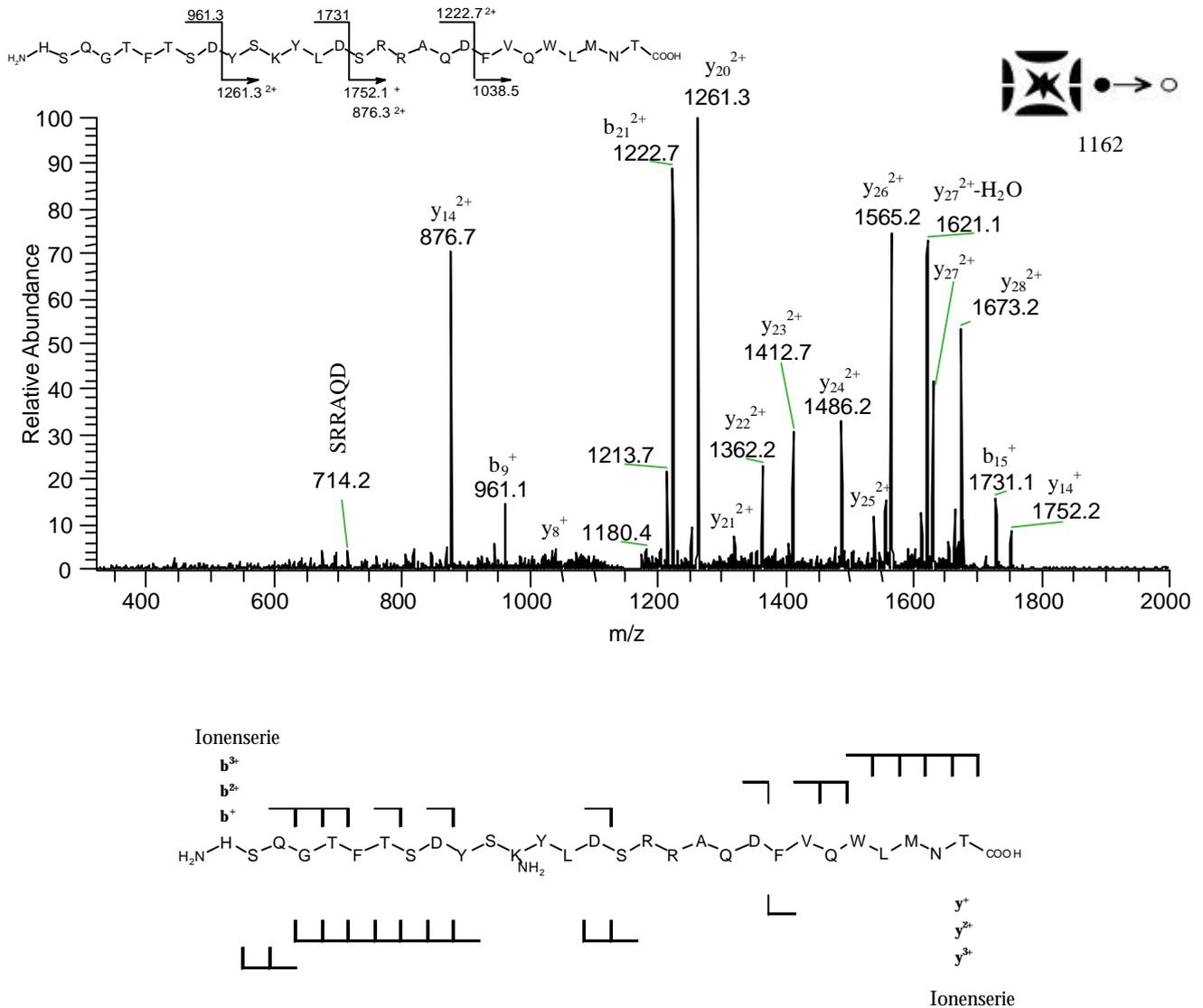


Abbildung 99: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des unterivatisierten Glucagon [M+3H]<sup>3+</sup>; Fragmentierungen des Molekül-Ions [M+3H]<sup>3+</sup> des unterivatisierten Glucagons.

So ist  $y_{14}^{2+}$  nun bevorzugt zweifach geladen. Eine doppelte Protonierung der Arginine ist nun nicht mehr auszuschließen. Bei einer fixierten doppelten Protonierung der Arginine sollte sich ein dreifach geladenes  $b_{21}^{3+}$ -Fragment finden lassen. Tatsächlich existiert dies nicht, so dass das zweite Proton auf den C-terminalen Bereich verteilt sein muss. Zudem ist  $b_{15}^{+}$  sowie  $b_9^{+}$  als Fragment noch intensiv, so dass ein Teil der Ladung auf diese Fragmente verteilt ist.

Wie aber kommt ein Ion  $b_9^{+}$  (m/z 961) zustande, wenn von einer Ladungslokalisierung an Lys und Arg ausgegangen werden kann? Der Bindungsbruch an Asp 9 (b-Ion wird gebildet) und an Asp 15 (y-Ion wird gebildet) unterstützt die These, dass maximal ein Proton lokalisiert ist. Das weitere Proton, ist nicht direkt an der Fragmentierung beteiligt, bleibt aber den Fragmenten als Ladung

erhalten. Die Bildung von zweifach geladenen b-Fragmenten ( $b_{20}^{2+}$ ,  $b_{19}^{2+}$ ,  $b_{18}^{2+}$ ) zeigt auch, dass ein mobiles Proton für weitere Fragmentierung (*charge-site-induced* Mechanismus) im C-terminalen Bereich sorgt.

Die *ipso*-b-Fragment-Ionenserie ( $b_{26}^{3+}$  bis  $b_{29}^{3+}$ ) zeigt, dass das dritte Proton auch in der Nähe des C-Terminus für Fragmentierungen unter Neutralverlust der C-terminalen Aminosäuren verantwortlich ist. Ab dem Fragment  $b_{25}$  lassen sich nur noch zweifach geladene Fragment-Ionen ( $b_{25}^{2+}$  bis  $b_{23}^{2+}$  und  $b_{21}^{2+}$ ) detektieren. Vermutlich ist mit dem Bindungsbruch an Asp 21 eine Ladungslokalisierung auf dem korrespondierenden  $y_8^+$ -Fragment verbunden.

Das Spektrum zeigt eine intensive Serie zweifach geladener  $y^{2+}$ -Fragmente ( $y_{20}^{2+}$  bis  $y_{28}^{2+}$ ) die zur Charakterisierung des N-Terminus noch durch  $y_{27}^{3+}$  und  $y_{28}^{3+}$  unterstützt werden. Das dritte Proton führt zu zahlreichen Bindungsbrüchen im N-terminalen Bereich, wobei die Ladung primär auf den b-Fragmenten verbleibt. Da lediglich  $b_9^+$  und  $b_8^+$  als stabile Fragmente detektiert werden können, ist davon auszugehen, dass weitere b-Fragment-Ionen instabil sind und weiterer Fragmentierung unterliegen.

Durch die dreifache Protonierung des Moleküls werden die Protonen nicht ausschließlich an basischen Zentren lokalisiert, sondern können auch durch Protonenaustausch innerhalb des Moleküls auf das Peptidrückgrat übertragen werden (mobile Protonen). Dies zeigt sich in der Fragmentierung des C-Terminus und des N-Terminus.

Um die Ladungsverteilung genauer zu untersuchen, wird in  $MS^3$ -Experimenten das doppelt geladene  $y_{14}^{2+}$ -Fragment-Ion (m/z 876.8) und das  $b_{21}^{2+}$ -Fragment-Ion (m/z 1262.7) fragmentiert.

#### **5.5.1.2.1 ESI- $MS^3$ -Spektren von Fragment-Ionen des underivatisierten Glucagon**

Als Hauptfragmentierung tritt wieder der Bindungsbruch an der C-terminalen Seite von Aspartat auf, wobei sich die Ladung vorwiegend auf dem  $b_6^+$ -Fragment (m/z 714) wieder findet. Das korrespondierende y-Fragment-Ion (m/z 1038) dagegen besitzt eine Intensität nahe dem Rauschen des Spektrums.

Daneben entsteht eine unvollständige Serie von b-Fragment-Ionen, die sowohl zweifach als auch einfach geladen auftreten. Kleinere b-Fragmente mit zwei Ladungen lassen sich nicht detektieren, woraus geschlossen werden kann, dass lediglich eines der beiden Arginine eine Ladung trägt. Das zweite Proton verbleibt nach dem Bindungsbruch Asp-Phe auf dem y-Fragment-Ion (m/z 1038). Die geringe Intensität des y-Fragment-Ions zeigt, dass es instabil ist und weiter zerfällt.

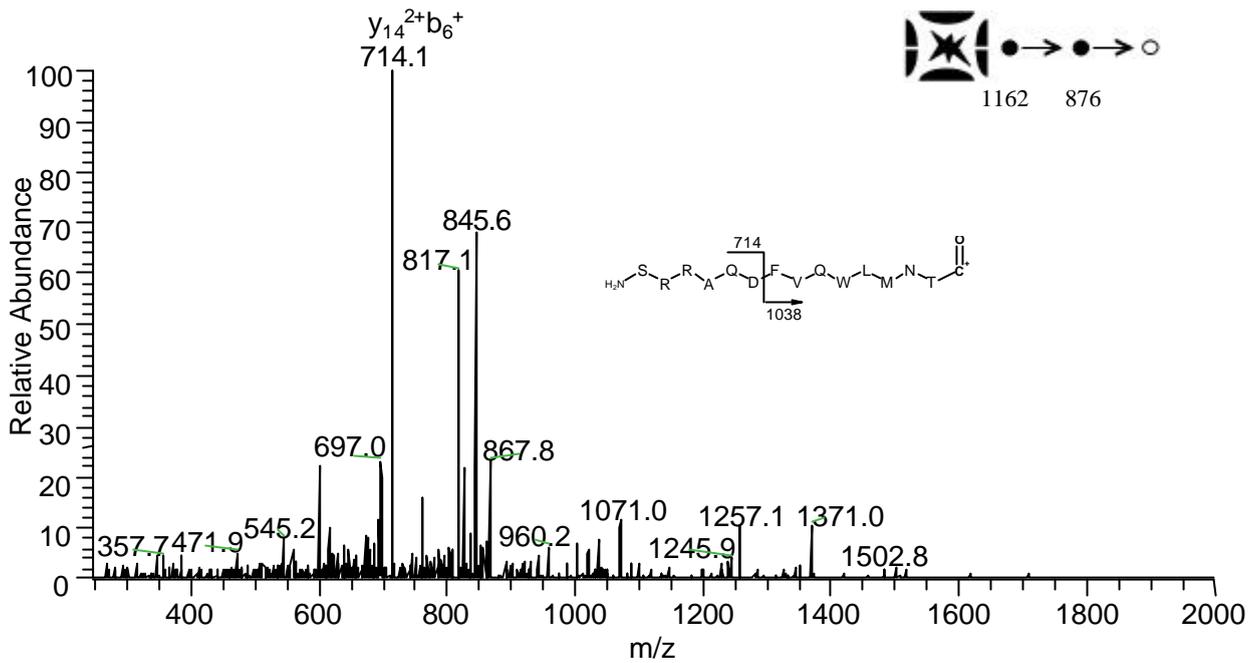


Abbildung 100: ESI-MS<sup>3</sup>-Spektrum des  $y_{14}^{2+}b_6^{+}$ -Fragment-Ions. Als Hauptfragmentierung tritt der Bindungsbruch am Aspartat auf ( $m/z$  714.1).

Es deutet vieles daraufhin, dass wiederum nur ein Arginin protoniert ist und das zweite Proton als mobiles Proton der Peptidkette für die Fragmentierung sorgt, bzw. beim Aspartat-Bindungsbruch auf dem C-terminalen Fragment verbleibt.

In einem weiteren MS<sup>3</sup>-Experiment wird das  $b_{21}^{2+}$ -Fragment-Ion untersucht, um weitere Hinweise auf die Ladungslokalisierung zu erhalten.

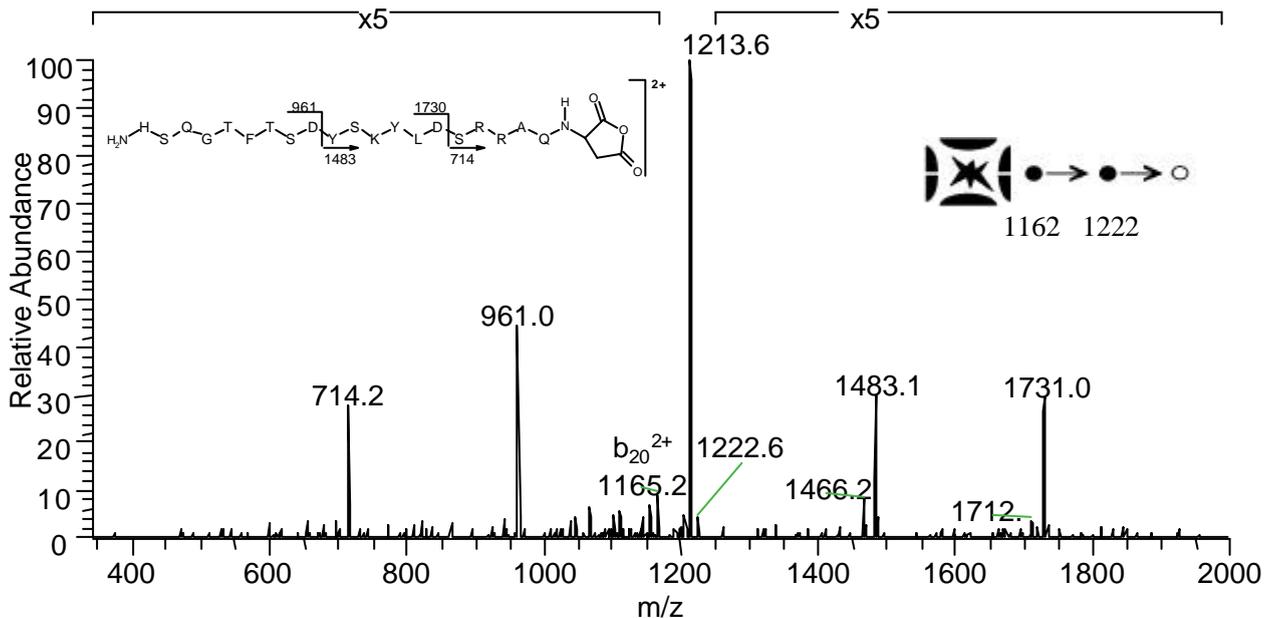


Abbildung 101: ESI-MS<sup>3</sup>-Spektrum des  $b_{21}^{2+}$ -Fragment-Ions von underivatisiertem Glucagon  $[M+3H]^{3+}$ .

Als basische Aminosäuren sind noch Lysin und zwei Arginine sowie der N-Terminus (Histidin) vorhanden. Das  $b_{21}^{2+}$ -Fragment besitzt durch den vom Aspartat induzierten Bindungsbruch einen cyclisierten C-Terminus.

Das Spektrum zeigt neben dem Neutralverlust von Wasser als Basispeak ( $m/z$  1213) vier weitere Fragment-Ionen, mit etwa gleicher Intensität, welche wiederum durch den Bruch der Aspartat-Bindungen entstanden sind. Die Ladungen verteilen sich dabei auf die beiden entstehenden Fragment-Ionen, so dass von einer gleichmäßigen Ladungsverteilung ausgegangen werden kann. Eine bevorzugte Ladungslokalisierung gibt es nicht, da zweifach geladene Fragmente nicht zu detektieren sind.

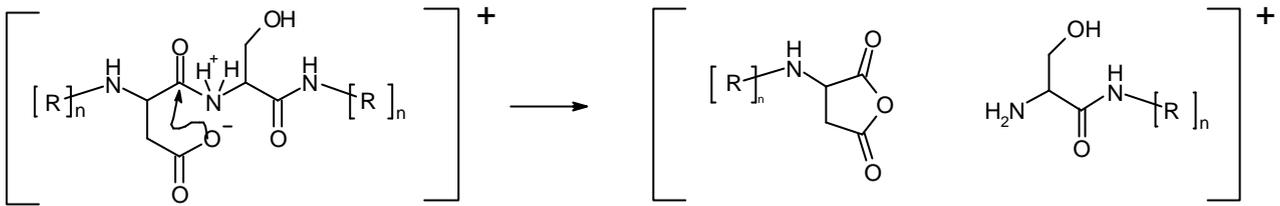


Abbildung 102: Fragmentierungsmechanismus des bevorzugten Bindungsbruches C-terminal zu Aspartat; Der erste Schritt ist dabei die Übertragung des Protons auf die Peptidbindung. Das Sauerstoffatom greift nukleophil am Carbonylkohlenstoff der Peptidkette an. Unter Abspaltung des  $\gamma$ -Fragmentes kommt es zur Zyklisierung und es bildet sich ein Säureanhydrid aus.

Das  $MS^3$ -Fragment-Ionenspektrum (siehe Abbildung 101) zeigt, dass dieser Mechanismus auch noch innerhalb der Fragment-Ionen abläuft. Das Fragmentierungsverhalten von Glucagon stützt die These, dass der Bindungsbruch (Asp-Xxx) ein vom Protonierungszustand des Molekül-Ions unabhängiger Mechanismus ist, der durch das leicht dissozierende Proton der Asp-Seitenkette induziert wird (siehe Abbildung 102).

### 5.5.1.3 Fragmentierung des Molekül-Ions $[M+4H]^{4+}$ von Glucagon

Im vierfachen Ladungszustand unterscheidet sich das Fragment-Ionenspektrum gravierend von den beiden vorherigen. Wurde bisher der Habitus des Spektrums durch die Bindungsbrüche des Aspartats bestimmt, so scheinen sie auf den ersten Blick einen geringen oder keinen Einfluss auf das Spektrum zu besitzen.

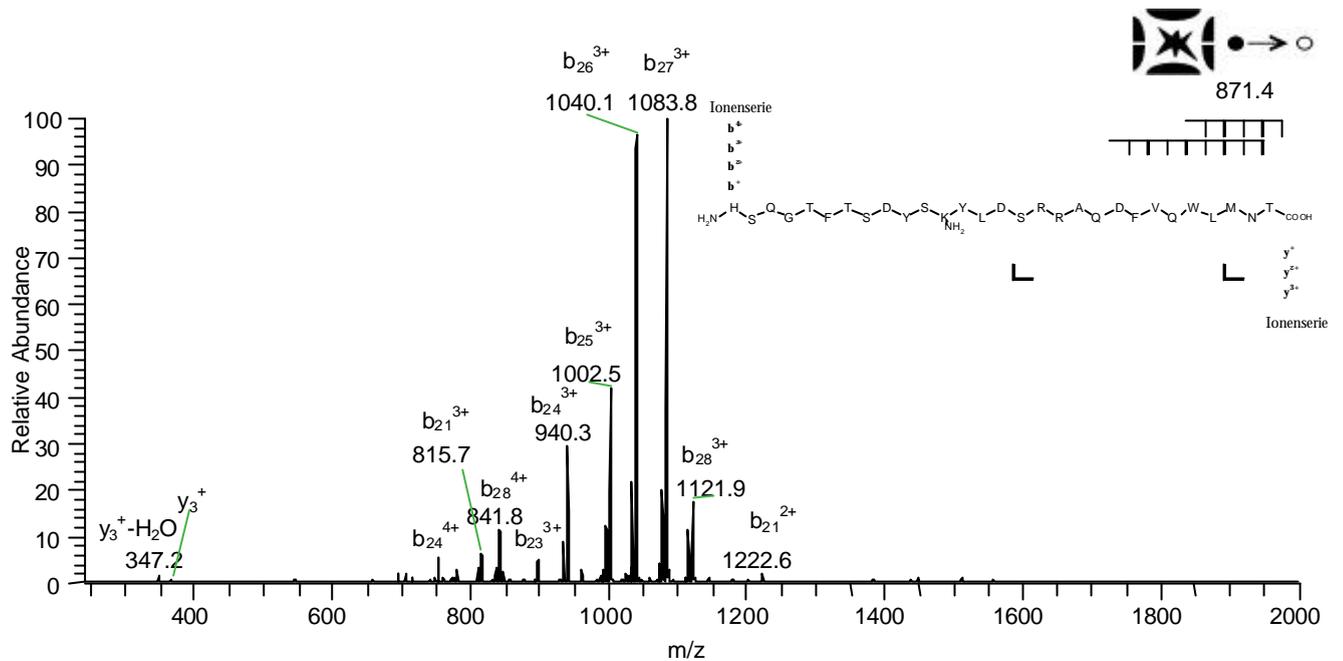


Abbildung 103: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des unterivatisierten Glucagons  $[M+4H]^{4+}$ .

Die intensivsten Fragmente gehören zur  $b^{3+}$ -Fragment-Ionenserie ( $b_{28}^{3+}$  bis  $b_{23}^{3+}$  und  $b_{21}^{3+}$  [bzw.  $b_{21}^{2+}$ ]). Das Fragment  $b_{22}^{3+}$  ( $m/z$  865.7) fehlt, kann aber bei geringeren Kollisionsenergien als überlagerter Peak von  $b_{29}^{4+}$  ( $m/z$  866.3) detektiert werden. Des Weiteren werden auch noch vierfach geladene  $b^{4+}$ -Fragment-Ionen ( $[b_{29}^{4+}]$ ,  $b_{28}^{4+}$  bis  $b_{25}^{4+}$ ) detektiert, so dass sich der C-Terminus des Glucagons belegen lässt (siehe Skizze in Abbildung 103).

Fragmentierungen im N-terminalen Bereich werden durch die zusätzliche vierte Ladung nicht mehr beobachtet. Als einzige  $y$ -Fragmente werden  $y_{14}^{2+}$  ( $m/z$  876.3) und  $y_3^+$  ( $m/z$  365) beobachtet.

### 5.5.2 Einfluss der Protonen auf das Fragmentierungsverhalten von Glucagon

Die Darstellung der Intensitäten als Summe über die Ladungszustände gleicher Fragment-Ionen (siehe Abbildung 104) zeigt deutlich, dass durch die vierfache Protonierung eine Verschiebung in der Fragment-Ionenbildung vom N-Terminus auf den C-Terminus stattgefunden hat. Es finden im Ladungszustand +4 ausschließlich Fragmentierungen im C-terminalen Bereich statt (siehe Abbildung 104 rechts), bei denen die Ladungen auf dem N-terminalen Bereich verbleiben (Entstehung von  $b$ -Fragmenten). Es konnten außer  $y_3^+$  keine korrespondierenden  $y$ -Fragment-Ionen gefunden werden. Vermutlich sind die  $y$ -Fragment-Ionen instabil und zerfallen weiter.

Durch die vier Ladungen und die damit verbundene niedrigere Kollisionsenergie sind die Aspartat-Bindungsbrüche nicht mehr favorisiert wie im dreifachen Ladungszustand. Die hohe Ladungsdichte führt nur noch zu intensiven Fragmentierungen im C-terminalen Bereich. Möglicherweise ist neben dem Lysin und dem Arginin jetzt auch der N-Terminus mit einer festen Ladung versehen, die verhindert, dass ein mobiles Proton im N-terminalen Bereich zu Fragmentierungen führt (Bildung von  $\gamma$ -Fragment-Ionen).

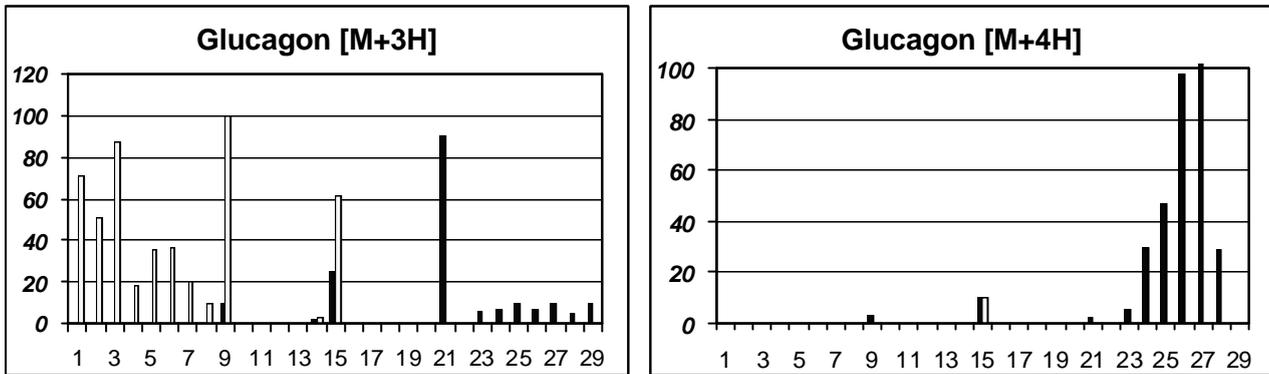


Abbildung 104: Fragment-Ionen-Intensitäten der Ladungszustände +3 (links) und +4 (rechts); Die Intensitäten der b-Fragment-Ionen sind durch dunkle Balken, die der  $\gamma$ -Fragment-Ionen sind durch helle Balken dargestellt.

Durch die vierte Ladung ist das mobile Proton auf den C-Terminus verschoben worden, so dass bei gleichzeitiger Ladungslokalisierung der übrigen Protonen es zu drei- und vierfach geladenen b-Fragment-Ionenserien kommt.

### 5.5.3 Acetylierung des Glucagons

Durch die Derivatisierung mit Essigsäureanhydrid werden die Aminogruppen des N-Terminus und die des Lysins acetyliert. Dadurch wird die Basizität der freien Aminogruppen vermindert, was zu einer verminderten Protonenaffinität in der Gasphase führt. Im Vergleich zum underivatisierten Peptid soll die Ladungslokalisierung zu Gunsten des oder der mobilen Protonen auf das Peptidrückgrat verschoben werden. Damit soll eine gleichmäßigere Fragmentierung des Peptids erreicht werden.

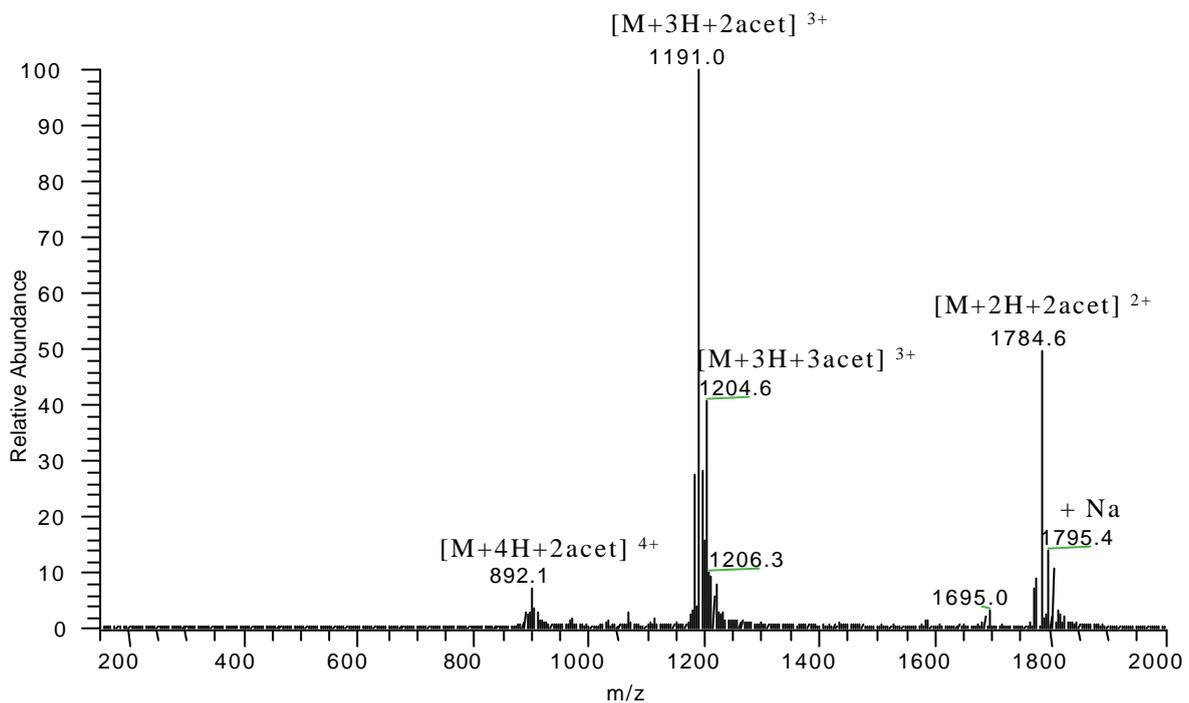


Abbildung 105: MS-Spektrum des acetylierten Glucagons.

Das Spektrum des acetylierten Glucagons zeigt vorwiegend die erwartete zweifache Acetylierung in den drei Ladungszuständen (+2, +3, +4). Als Verunreinigung sind noch eine Überacetylierung und Natrium-Addukt-Ionen zu erkennen.

### 5.5.3.1 Fragmentierung des zweifach acetylierten Glucagons $[M+2H]^{2+}$

Die fünf intensivsten Ionen des Spektrums sind Fragmente aus den Bindungsbrüchen C-terminal zu Aspartat. Sowohl die  $y^{2+}$ -Fragment-Ionenserie als auch die  $b^{2+}$ -Fragment-Ionenserie zur Charakterisierung der Termini sind vorhanden ( $y_{28}^{2+}$ - $y_{20}^{2+}$  und  $b_{29}^{2+}$ - $b_{20}^{2+}$ ). Gegenüber dem underivatisierten Protein sind diese intensiver, wenn auch mit 2% relativer Intensität immer noch sehr niedrig. Die einfach geladene b-Ionenserie ( $b_5$ - $b_{16}$ ) bestätigt die N-terminalen Aminosäuren. Eine Fragmentierung in der Nähe des Lysins zeigt, dass die ehemals lokalisierte Ladung verschoben worden ist.

Der Bindungsbruch an Aspartat 15 ergibt sowohl das einfach als auch das zweifach geladene  $y_{14}$ -Fragment ( $m/z$  1752.4 bzw. 876.6  $m/z$ ). Dies zeigt, dass nach der Fragment-Ionenbildung ein

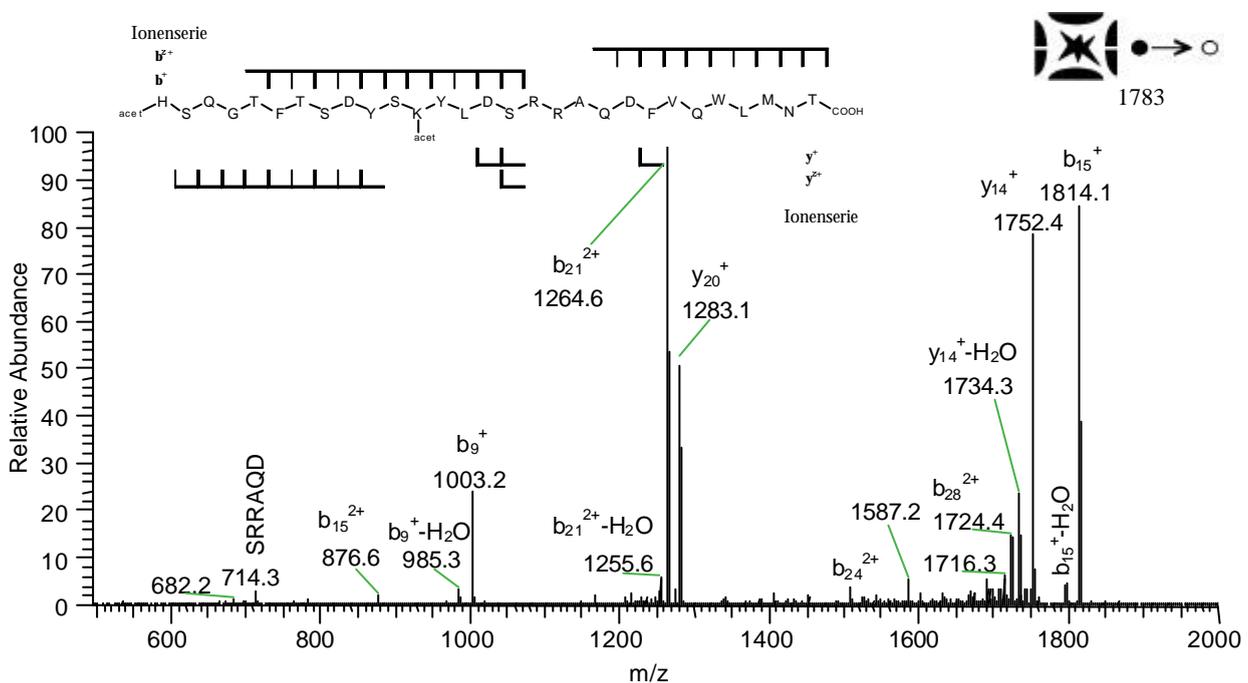


Abbildung 106: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Molekül-Ions  $[M+2H]^{2+}$  von acetyliertem Glucagon.

Proton auf dem C-Terminus lokalisiert sein muss. Die hohe Intensität des einfach geladenen  $y_{14}^+$ -Fragments ( $m/z$  1752.4) deutet auf eine starke Ladungslokalisierung hin. Da  $y_9^+$  wenig intensiv ist, kommt die C-terminale Aminosäure bzw. die Carboxylat-Gruppe als bevorzugter Ladungsträger nicht in Frage. Vielmehr scheint eine Ladung am Arginin fixiert zu sein.

Die zweifach geladenen Ionen entstehen durch Neutralverlust und Verbleib der beiden Protonen auf dem detektierten Fragment. Somit ist es nicht verwunderlich, dass „hohe“ Fragmente der beiden Ionenserien entstehen, da zum einen das Arginin in der Mitte der Sequenz liegt, und zum anderen noch viel „Platz“ für das zweite Proton auf der Peptidkette verbleibt.

Durch die Acetylierung ist das Proton, welches im underivatisierten Glucagon noch am Lysin fixiert ist, auf das Peptidrückgrat geschoben worden. Dort kommt es sowohl im N-terminalen als

auch im C-terminalen Bereich zu Fragment-Ionenserien, deren Intensität aber noch deutlich geringer ist als die der intensiven Fragment-Ionen, die durch die instabile Aspartat-Bindung entstanden sind.

### 5.5.3.2 Fragmentierung des zweifach acetylierten Glucagons $[M+3H]^{3+}$

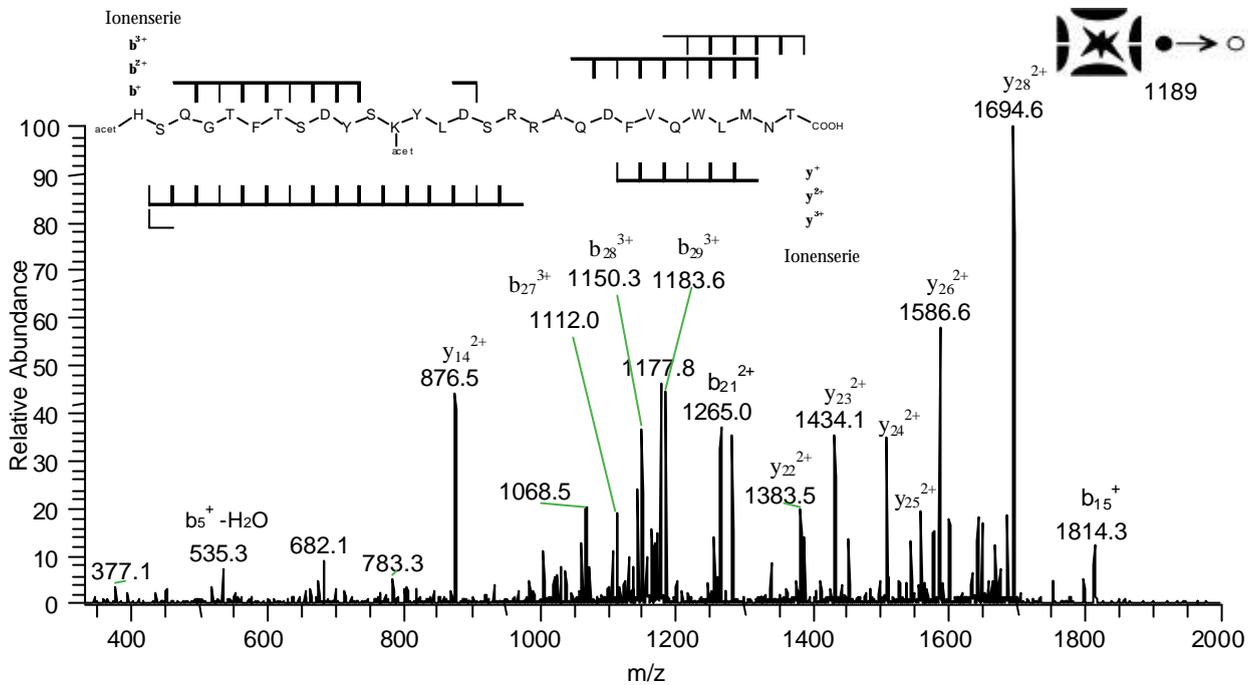


Abbildung 107: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Molekül-Ions  $[M+3H]^{3+}$  von acetyliertem Glucagon.

Obwohl Lysin als Ladungszentrum durch die Acetylierung eine verringerte Basizität hat, zeigt das dreifach geladene Molekül-Ion im MS-Spektrum die größte Intensität (siehe Abbildung 105). Bedingt durch die Größe des Proteins ist eine Ionisierung mit drei Protonen möglich.

Das Fragment-Ionenspektrum zeigt eine *ipso*-b-Fragment-Ionenserie ( $b_{29}^{3+}$ - $b_{24}^{3+}$ ), die durch die  $b^{2+}$ -Ionenserie ( $b_{27}^{2+}$ - $b_{20}^{2+}$ ) fortgeführt wird. Mit abnehmender Fragment-Ionengröße sind drei Ladungen nicht mehr zu stabilisieren. Statt dessen bildet sich die korrespondierende einfach geladene  $y^+$ -Fragment-Ionenserie, die ein Proton zu stabilisieren vermag. So wird durch das mobile Proton im C-terminalen Bereich des Peptids der Bindungsbruch induziert. Je nach Größe der verbleibenden Fragmente wird die Ladung auf dem größeren b-Fragment stabilisiert, oder auf das y-Fragment-Ion übertragen.

Analoges gilt für den N-terminalen Bereich. Die *ipso*-Serie der  $y^{3+}$ -Fragment-Ionen besteht nur aus  $y_{28}^{3+}$ . Die n-1 fach geladene y-Ionenserie ( $y_{28}^{2+}$ - $y_{13}^{2+}$ ) ist dagegen intensiv und durchgehend. Es sind Fragment-Ionen neben Lysin detektierbar (siehe Skizze in Abbildung 106). Durch die Acetylierung ist der Einfluss des basischen Zentrums am Lysin auf die Fragmentierung verringert. Die korrespondierenden b-Fragmente ( $b_3^+$ - $b_{10}^+$ ) tragen erwartungsgemäß eine Ladung, die bei der

Fragmentierung am N-terminalen Ende verbleibt. Diese Ionenserie endet vor dem derivatisierten Lysin, so dass hier keine Sequenzinformation über den Bereich des basischen Zentrums gewonnen werden kann. Erst das Fragment  $b_{15}^+$  ist wieder intensiv, da dieser Bindungsbruch durch Aspartat erfolgt.

Anders als im Spektrum des underivatisierten Glucagons (Ladungszustand +2 und +3, siehe 5.5.1.1 und 5.5.1.2) sind die dominanten Aspartat-Brüche zu Gunsten durchgängiger Fragment-Ionenserien zurückgedrängt worden.

### 5.5.3.3 Fragmentierung des zweifach acetylierten Glucagons $[M+4H]^{4+}$

Durch die vierfache Protonierung des Proteins ergibt sich ein deutlicher Ladungsüberschuss, der nicht mehr durch basische Zentren (Arginin bzw. N-Terminus) kompensiert werden kann. Für die Protonierung kommen die beiden Arginine sowie möglicherweise das Histidin am N-Terminus in Frage. Das vierte Proton sollte als mobiles Proton die Fragmentierung im Peptidrückgrat steuern.

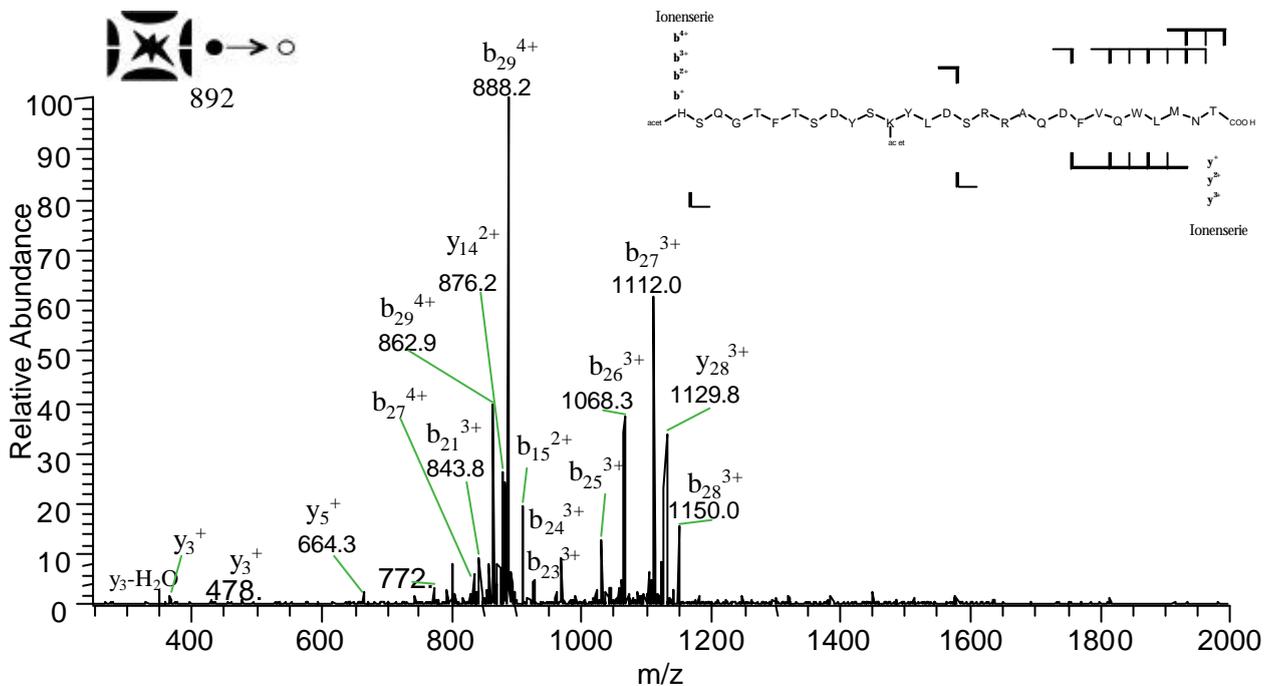


Abbildung 108: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des Molekül-Ions  $[M+4H]^{4+}$  von acetyliertem Glucagon.

Die dominante *ipso*-Fragment-Ionenserie ( $b_{29}^{4+}$ - $b_{27}^{4+}$ ) wird durch die dreifach geladene b-Ionenserie ( $b_{28}^{3+}$ - $b_{23}^{3+}$ ,  $b_{21}^{3+}$ ) fortgeführt. Die Fragmentierung geschieht dabei entweder durch eine am C-Terminus lokalisierte Ladung oder aber durch ein mobiles Proton, welches nach dem Bindungsbruch auf dem C-terminalen Ende verbleibt. Das Auftreten von schwachen y-Fragment-Ionen, die nur eine Ladung tragen und das Fehlen zweifach geladener y-Fragment-Ionen spricht dafür, dass nur ein geringer Teil der Fragmentierung mit einer C-terminal lokalisierten bzw. stabilisierten Ladung abläuft. Die hohe Intensität der dreifach geladenen  $b^{3+}$ -Fragment-Ionen lässt sich damit

erklären, dass die hohe Ladungsdichte an den Argininen das mobile Proton in seiner Mobilität einschränkt und es nur noch zu Bindungsbrüchen im C-terminalen Bereich des Glucagons kommt. Der Einfluss der Bindungsbrüche durch Aspartat ist weiter zurückgedrängt worden. Das  $b_{15}$ -Ion liegt im Vergleich zu den MS-Experimenten niedrigerer Ladungszustände nun ausschließlich als zweifach geladenes Ion ( $m/z$  907.7) vor. Für den Verbleib der beiden Ladungen kommt in diesem Fragment nur das Histidin und das Peptidrückgrat als Ladungsträger in Frage, da sowohl N-Terminus als auch Lysin acetyliert sind. Histidin ist somit ein potentieller Ladungsträger, wenn die Protonenaffinität anderer basischer Zentren vermindert wurde. Das zum  $b_{15}^{2+}$ -Fragment korrespondierende  $y_{14}^{2+}$ -Fragment ist mit gleicher Intensität vorhanden. Bedingt durch die vorgegebene Tendenz zum Bindungsbruch am Aspartat, wird hier eine gleichmäßige Verteilung der Ladungen beobachtet.

Das Ion  $y_{28}^{3+}$  ( $m/z$  1129.8) tritt als einziges hochgeladenes y-Fragment auf (siehe Abbildung 108). Ein vierfach geladenes Ion der y-Serie existiert nicht. Im *in-source*-CID-Spektrum fällt als intensivstes Fragment das  $b_1^+$ -Fragment ( $m/z$  180) auf, welches nur aus dem acetylierten N-terminalen Histidin besteht. Die hohe Intensität lässt auf eine stark lokalisierte Ladung am Histidin schließen. Ob die Ladung schon vor der Fragmentierung lokalisiert ist oder ob sie erst durch den Mechanismus auf das b-Fragment gelangt, lässt sich aus dem Spektrum nicht erkennen. Tatsache ist nur, dass die Ladung nach der Fragment-Ionenbildung nicht mehr für weitere Bindungsbrüche zur Verfügung steht, so dass  $y_{27}^{3+}$  deutlich an Intensität verliert, bzw. ausschließlich  $y_{28}^{3+}$  entsteht. Für eine verbesserte Fragmentierung steht das Proton also nicht mehr zur Verfügung, sondern wird durch die hohe Ladungsdichte auf dem Molekül an das N-terminale Ende geschoben.

Mit zunehmendem Ladungszustand wird auch für das acetylierte Glucagon beobachtet, dass die Bildung von b-Ionen bevorzugt ist. Serien von y-Fragmenten stören so nicht bei der Analyse, können aber auch keine Information über den N-Terminus liefern.

### 5.5.4 Einfluss der Acetylierung auf das Fragmentierungsverhalten von Glucagon

Im Ladungszustand +2 (siehe Abbildung 109, oben) ist der Einfluss der Acetylierung auf das Fragmentierungsverhalten des Glucagons gering. Es entstehen kaum neue Fragment-Ionen. Die relativen Intensitäten der Hauptbindungsbrüche sind so verändert, dass der Bindungsbruch am

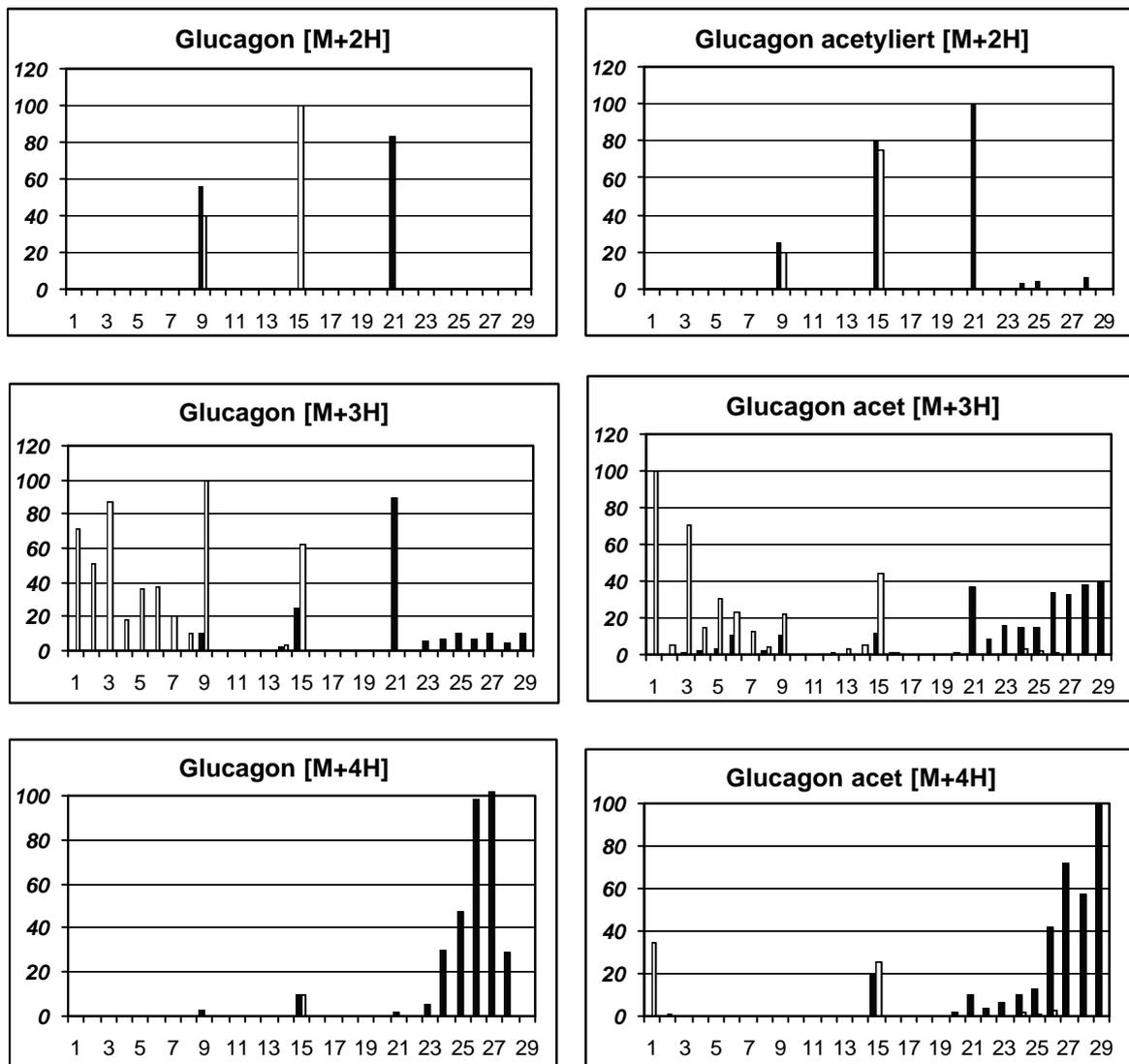


Abbildung 109: Vergleich der Fragment-Ionen-Intensitäten von unterivatisiertem und acetyliertem Glucagon; die hellen Balken stellen Intensitäten der y-Fragmente dar, die dunklen Balken die Intensitäten der b-Fragmente.

Aspartat in Position 9 mit verminderter Intensität auftritt und der Bindungsbruch am Aspartat in Position 20 jetzt die intensivsten Fragment-Ionen liefert.

Für den Ladungszustand +3 (siehe Abbildung 109, mittlere Reihe) lässt sich durch die Acetylierung eine intensivere Fragmentierung des C-terminalen Bereiches des Glucagons beobachten. Die Fragmentierung des N-terminalen Bereiches wird durch die Acetylierung nicht beeinflusst. Die im

underivatisierten Glucagon (Ladungszustand +3) intensiven Bindungsbrüche am Aspartat sind durch die Acetylierung vermindert worden.

Für den Ladungszustand +4 wird im underivatisierten Glucagon eine intensive Fragmentierung im C-terminalen Bereich beobachtet. Die Intensitäten der Bindungsbrüche am Aspartat sind nur noch mit geringer Intensität zu beobachten. Durch die Acetylierung wird die Entstehung weiterer b-Fragment-Ionen am C-Terminus gefördert. Die Fragmentierung am Aspartat in Pos 15 ist leicht erhöht. Auffallend ist noch die Bildung des einzigen  $\gamma$ -Fragmentes am N-Terminus, bei dem das acetylierte Histidin abgespalten wird. Die Existenz des acetylierten  $b_1^+$ -Fragment-Ions beweist die Ladungslokalisierung am Histidin.

Die bevorzugten Bindungsbrüche am Aspartat lassen sich sowohl durch Acetylierung als auch durch den erhöhten Ladungszustand des Glucagons vermindern. Der erhöhte Protonierungsgrad des Peptids ermöglicht zudem neue Fragmentierungen. Mit anderen Worten: In niedrigen Ladungszuständen sind die Protonen durch die basischen Aminosäuren fixiert, oder zumindest in ihren Eigenschaften, Fragmentierungen zu ermöglichen stark eingeschränkt. Der Einfluss auf das Spektrum durch die Acetylierung ist daher nicht so gravierend, wenn basische Stellen derivatisiert werden, die in die Hauptfragmentierung (Aspartatbindungsbruch) nicht involviert sind. Die in (5.5.3.1) beschriebenen Fragmentierungen an den Termini des Peptids sind im Vergleich zu den Aspartat-Bindungsbrüchen wenig intensiv.

### 5.5.5 Fragmentierung des sulfonylierten Glucagons

Durch die Derivatisierung mit Chloro-Acetyl-Sulfonylchlorid wird eine negative Ladung eingeführt. Das Fragment-Ionenspektrum soll beeinflusst werden, indem das mobile Proton vermehrt an den N-Terminus gezogen wird. Durch die erhöhte Aufenthaltswahrscheinlichkeit soll eine bessere Fragmentierung erreicht werden. Unter den wasserfreien Reaktionsbedingungen wird ausschließlich ein Monoderivat erhalten. Dabei muss von Stellungsisomeren ausgegangen werden, da bei gleichem Masse/Ladungsverhältnis sowohl der N-Terminus als auch das Lysin derivatisiert sein könnte.

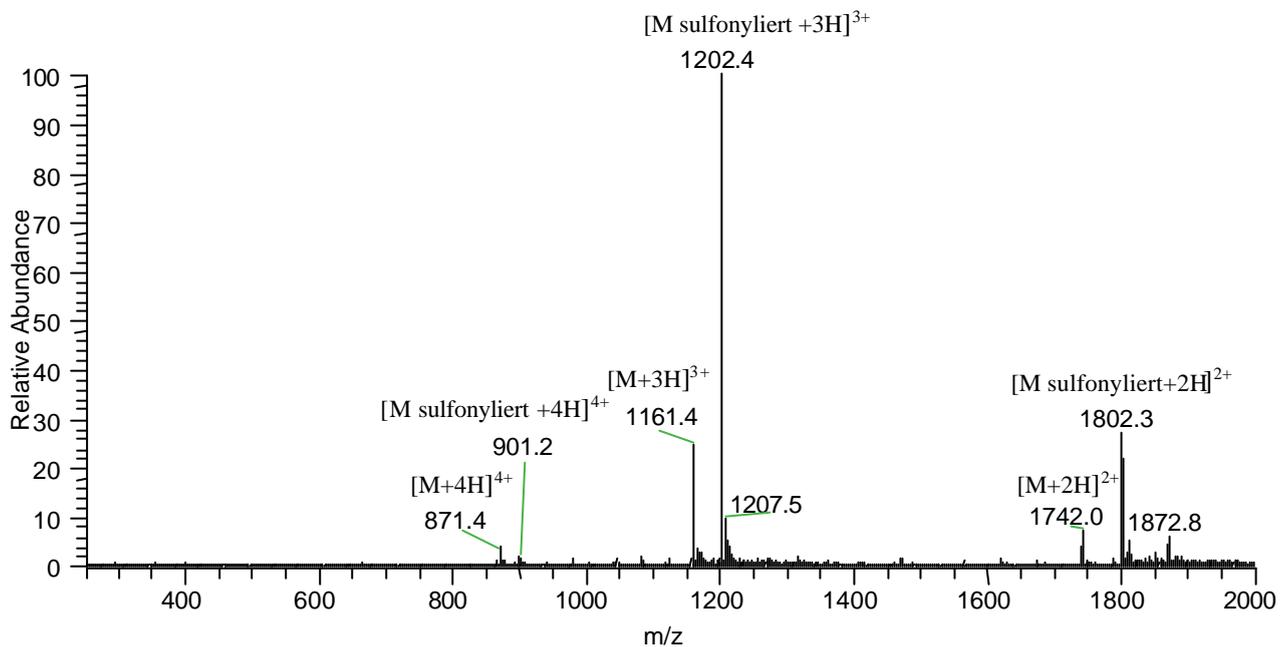


Abbildung 110: MS-Spektrum des sulfonylierten Glucagons.

Das MS-Spektrum zeigt, dass die Umsetzung mit Chloro-Acetyl-Sulfonylchlorid nicht vollständig ist, da noch Ionen des Eduktes detektiert werden. Für eine Datenakquisition der derivatisierten Proteine war deren Intensität aber ausreichend.

#### 5.5.5.1 Fragmentierung des sulfonylierten Glucagons [M+2H]<sup>2+</sup>

Das Fragment-Ionenspektrum zeigt als Basispeak das Fragment-Ion  $[M+2H-H_2O]^{2+}$ ; ausgehend von diesem Ion ( $b_{29}^{2+}$ ) lässt sich die *ipso*-b-Fragment-Ionenserie ( $b_{28}^{2+}$ - $b_{23}^{2+}$ ) bestimmen. Die Intensitäten sind gut, so dass sich der Ladungszustand der  $b^{2+}$ -Fragment-Ionen durch ihr Isotopenmuster bestimmen lässt. Daneben treten noch einfach geladene b-Fragment-Ionen auf, die durch den Bruch der C-terminalen Aspartat-Bindung entstanden sind ( $b_9^+$  m/z 1083 und  $b_{15}^+$  m/z 1853). Interessanterweise existiert das  $b_9$ -Fragment auch ohne Derivat (m/z 961, siehe Abbildung 111). Dieses Ion kann entweder durch einen Verlust der negativen Ladungsgruppe erklärt werden,

oder aber durch eine teilweise Derivatisierung an Lys 12. Das  $b_{15}^+$ -Fragment weist kein begleitendes Fragment-Ion auf, welches durch einen Verlust des Derivats entstanden ist, was auf die teilweise Derivatisierung des Vorläufer-Ions an Lysin hindeutet. Andererseits lassen sich für die  $y$ -Fragment-Ionen, die Lysin enthalten (dies sind alle größeren  $y$ -Fragmente nach  $y_{18}$ ) keine Ionen finden, die eine Derivat-Gruppierung (Erhöhung der Masse um 122 Da) besitzen. Somit sind die underivatisierten  $b$ -Fragment-Ionen ( $b_9^+$ ,  $b_{10}^+$ ) vermutlich durch Abspaltung der Derivat-Gruppierung entstanden.

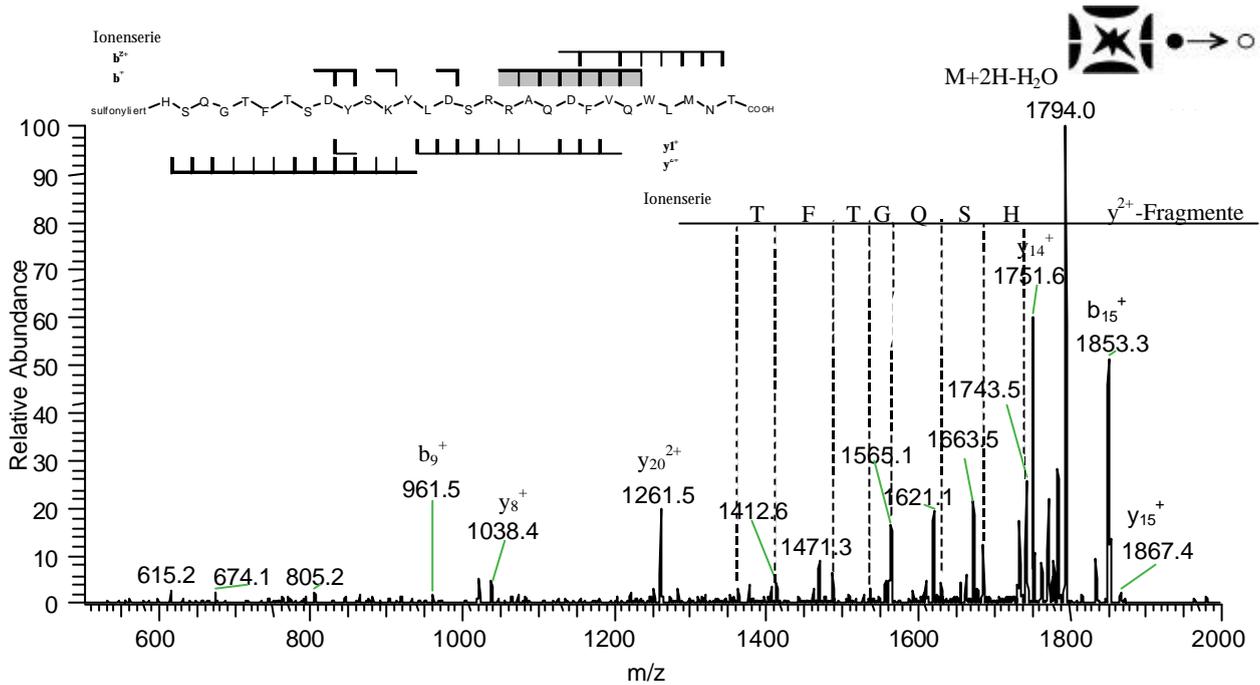


Abbildung 111: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des sulfonylierten Glucagons  $[M+2H]^{2+}$ .

Die korrespondierenden  $y$ -Fragmente sind vorhanden. So ist  $y_{20}^{2+}$  zweifach protoniert. Nach dem Bindungsbruch ist eine zweite Ladung auf dem C-terminalen Fragment enthalten. Sie wird weder zur Kompensation des negativen Derivats noch zum Verbleib auf dem korrespondierenden  $b$ -Fragment benötigt. Das Auftreten von  $b_9$  legt aber nahe, dass ein Proton auf dem N-terminalen Fragment stabilisiert werden kann. Für den Mechanismus des Bindungsbruches bedeutet dies, dass es mindestens einen Reaktionsweg geben muss, nachdem die positive Ladung auf dem N-terminalen Fragment verbleibt. Das Histidin ist vermutlich protoniert.

Ausgehend vom zweifach geladenen Vorläufer-Ion lässt sich die *ipso*- $y^{2+}$ -Fragment-Ionserie ( $y_{28}^{2+}$ - $y_{17}^{2+}$ ) bestimmen. Der Verlust des Derivats unter Generierung des ersten  $y$ -Fragments ist  $m/z$  1741.7. Gleichzeitig wird dieser Peak von  $b_{28}^{2+}$  ( $m/z$  1743) überlagert, so dass die eigentliche  $y$ -Fragment-Ionserie mit  $y_{28}^{2+}$  beginnt. Die direkte Identifizierung der N-terminalen Aminosäure gelänge bei einer *de novo* Sequenzierung dennoch. Durch die Derivatisierung lässt sich aus dem zweifach geladenen Protein der N-Terminus vollständig belegen. Die ersten 10 Aminosäuren

können bestimmt werden. Obwohl die verbleibenden Aminosäuren noch zwei basische Zentren (Arg) enthalten, sind keine weiteren doppelt geladenen Fragment-Ionen detektiert. Erst  $y_{14}^+$  ist wieder deutlich intensiv vorhanden. Obwohl das  $y_{14}^+$ -Fragment 14 Aminosäuren lang ist und mit zwei Argininen ausreichend basisch sein sollte, wird lediglich eine stabilisierte Ladung vorgefunden.

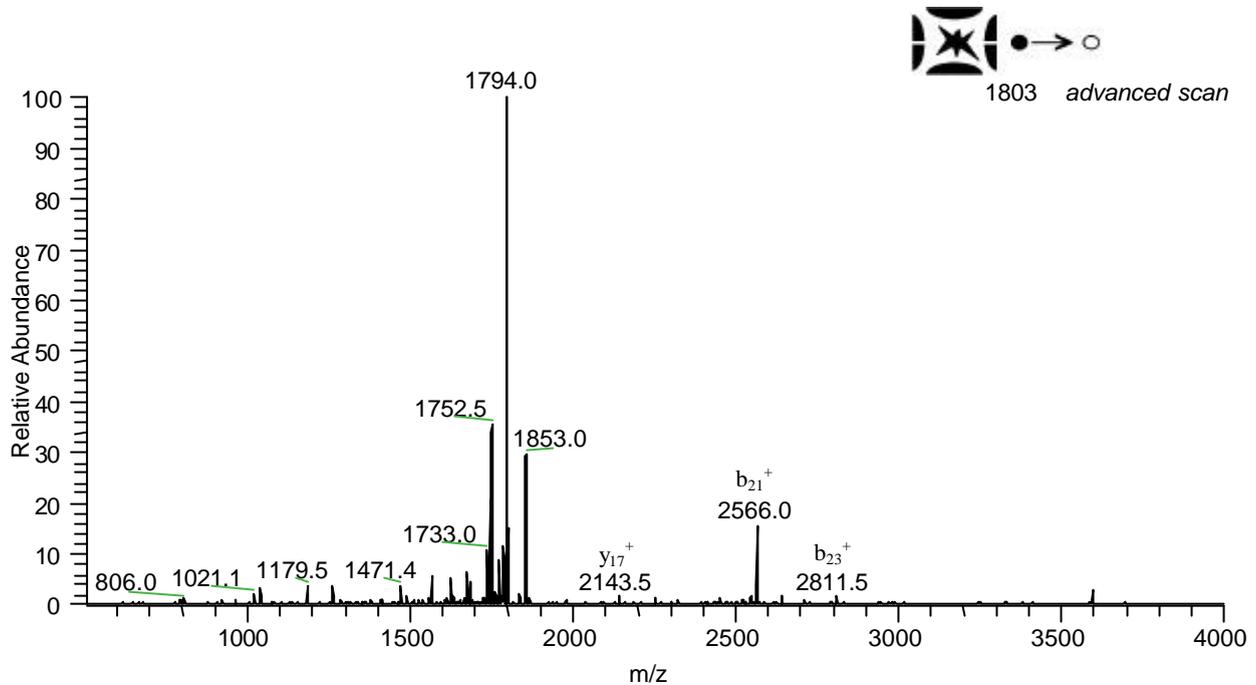


Abbildung 112: Advanced Scan des sulfonylierten Glucagons  $[M+2H]^{2+}$ . Der m/z Bereich bis 2000 weist die gleichen Fragment-Ionen auf, wie das Spektrum in Abbildung 111.

Durch die Messung im hohen Massenbereich über m/z 2000 (*advanced scan* siehe Abbildung 112) konnten weitere einfach geladene  $y$ -Fragmente detektiert werden ( $y_{20}^+$  und  $y_{17}^+$ ). Zu  $y_{20}^+$  existiert noch das doppelt geladene Fragment (m/z 1261), so dass auch von unterschiedlichen Mechanismen für die Fragment-Ionenbildung ausgegangen werden muss. Es werden bei dem doppelt geladenen Fragment beide Ladungen stabilisiert, während bei dem einfach geladenen Fragment eine Ladungsteilung nach der Fragmentierung stattgefunden haben muss. Das Fragment  $y_{17}^+$  ist ungewöhnlich, da in unmittelbarer Nähe zum Lysin keine oder wenig Fragment-Ionen beobachtet werden. Durch die am Lysin lokalisierte Ladung sollte die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des mobilen Protons stark herabgesetzt sein. Ein Bindungsbruch nach dem *charge-site-induced* Mechanismus sollte nicht möglich sein. Entweder ist durch die Derivatisierung am N-Terminus die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des mobilen Protons verändert oder die negative Ladung kompensiert die positive Ladung des Lysins, so dass eine durchgehende Fragmentierung in der Peptidkette möglich ist.

Ebenfalls im hohen Massenbereich wird eine einfach geladene b-Fragment-Ionenserie ( $b_{17}^+$  bis  $b_{24}^+$ ) beobachtet. Sie zeigt Informationen über die Fragment-Ionen neben den Argininen. Solche Fragmente treten selten auf. Die korrespondierenden y-Fragmente sind ebenfalls einfach geladen und decken einen großen Bereich der C-terminalen Sequenz ab.

Die Ionen der b-Fragmentserie lassen sich ebenfalls detektieren. Durch die *ipso* Fragment-Ionenserie ( $b_{29}^{2+}$  bis  $b_{23}^{2+}$ ) ist der C-Terminus beschrieben und durch die bereits beschriebene Serie im hohen Massenbereich bestätigt bzw. fortgeführt. Die im Spektrum des underivatisierten Glucagons beobachtete hohe Intensität von  $b_{21}^{2+}$  hat abgenommen, was ein Indiz für den verminderten Einfluss des Aspartats auf die Hauptfragmentierungen darstellt. Einige b-Fragment-Ionen mit nur einem Proton beschreiben die typischen Bindungsbrüche neben Asp 9 ( $b_9^+$  bzw.  $y_{19}^+$ ) und Asp 15 ( $b_{15}^+$  bzw.  $y_{14}^{2+}$ ).

### 5.5.5.2 Fragmentierung des sulfonylierten Glucagon $[M+3H]^{3+}$

Durch die zusätzliche Ladung sollte das Spektrum gegenüber dem des zweifach geladenen Vorläufer-Ions ein zusätzliches mobiles Proton besitzen, wodurch eine verbesserte Fragmentierung des Peptidrückgrates möglich ist.

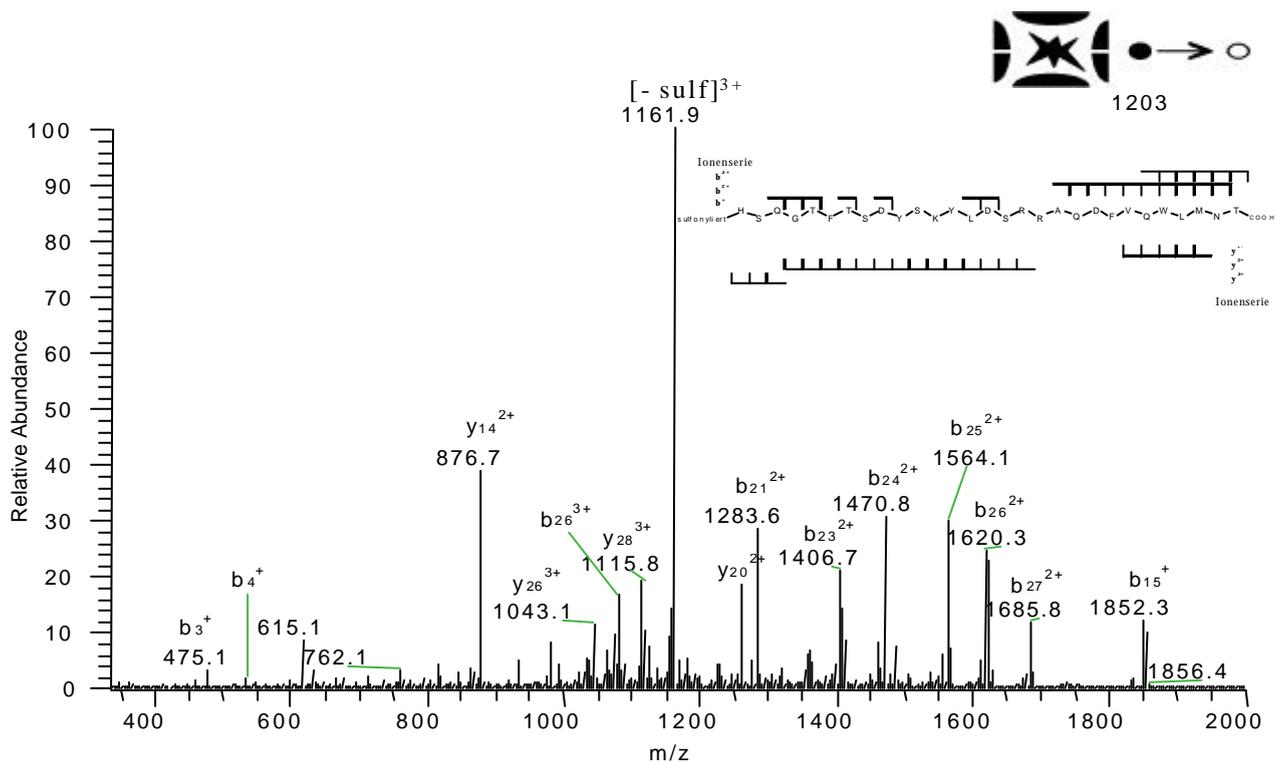


Abbildung 113: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des sulfonylierten Glucagons  $[M+3H]^{3+}$ .

Das Spektrum weist eine Reihe von intensiven Ionen auf. Der Basispeak ist durch die Abspaltung des Derivats unter Generierung des  $y_{29}^{3+}$  Ions entstanden. Durch sukzessives Annotieren der kleineren Fragmente gleichen Ladungszustandes, lässt sich der N-Terminus bestimmen. Die



Der Basispeak ist der Neutralverlust von Wasser aus dem vierfach geladenen Vorläufer-Ion ( $m/z$  897.4). Im Spektrum (rechts vom Basispeak) werden die  $n-1$  fach geladenen Fragment-Ionenserien detektiert. Die  $b^{3+}$ -Serie belegt die C-terminale Aminosäuresequenz ( $b_{28}^{3+}$  -  $b_{23}^{3+}$ ), welche durch die intensitätsschwächere zweifache Ionenserie ( $b_{26}^{2+}$  -  $b_{19}^{2+}$ ) bestätigt und fortgeführt wird. Daneben treten noch vereinzelte b-Ionen ( $b_{15}$ ,  $b_{16}$  und  $b_5$ ,  $b_6$ ) auf, die aber für die Interpretierbarkeit der Sequenz keine weiteren Informationen liefern.

Von den  $y$ -Fragmenten existiert nur die  $y^{3+}$ -Serie. Der Ladungszustand deutet darauf hin, dass nach der Fragment-Ionenbildung die vierte Ladung am N-Terminus verblieben ist. Der Grund hierfür liegt in der mangelnden Stabilisierung der vierten Ladung auf dem  $y$ -Fragment. Durch die negative Ladung wird das Proton an den N-Terminus gezogen, wo dieses dann die Fragmentierung einleitet. Diese Ladung verbleibt am N-Terminus, wird aber als Ion nicht mehr detektiert, da es entweder zu klein ist<sup>XIX</sup> oder aber weiter fragmentiert.

### 5.5.6 Einfluss der Sulfonylierung auf das Fragmentierungsverhalten des Glucagons

Durch die Derivatisierung mit Acetyl-Sulfonylchlorid wird eine negative Gruppe an den N-Terminus gebracht. Hinweise auf eine Derivatisierung des Lysins konnten in den Spektren nicht gefunden werden. Obwohl eine negative Ladung am N-Terminus platziert wurde, werden die zuvor beobachteten Ladungszustände (+2, +3, +4) beobachtet.

Im Ladungszustand +2 wird durch die Sulfonylierung die Fragmentierung weiterer Bindungen im C- und N-terminalen Bereich gefördert. Die Protonen sind nun nicht mehr an den basischen Zentren fixiert, sondern ermöglichen die Bildung intensiver Fragment-Ionen an den Termini des Peptids.

So können im Ladungszustand +2 die Aminosäuresequenzen beider Termini bestimmt werden. Die zweifach geladenen  $y^{2+}$ -Fragmente werden durch Neutralverlust gebildet, was für einen *charge-site-induced* Mechanismus spricht, der durch ein mobiles Proton an sämtlichen N-terminalen Aminosäuren ermöglicht wird. Da diese Fragmente im underivatisierten Glucagon nicht gebildet werden, ist von einer Fixierung der beiden Protonen an Histidin in Position 1, dem N-Terminus, dem Lysin, den Argininen oder dem C-Terminus auszugehen.

Das Fragmentierungsverhalten des sulfonylierten Glucagons im Ladungszustand +2 ähnelt dem des underivatisierten Glucagons im Ladungszustand +3. Dort wird das dritte Proton als mobiles Proton auf den N-Terminus verschoben, was zu intensiven  $y$ -Fragmenten führt. Für den

---

<sup>XIX</sup> Der Massenbereich des  $MS^2$ -Spektrums erstreckt sich gerätetechnisch bedingt nur auf 27% des  $m/z$ -Wertes des Vorläufer-Ions.

Ladungszustand +3 wird die Bildung von  $\gamma$ -Fragmenten durch die Sulfonylierung noch verbessert. Die Aminosäuresequenz kann durchgehend bis zur Mitte des Peptids belegt werden (siehe Abbildung 115, mitte rechts). Auch sind die  $b$ -Fragment-Ionen zur Bestimmung der C-terminalen Aminosäuresequenz deutlich intensiver geworden.

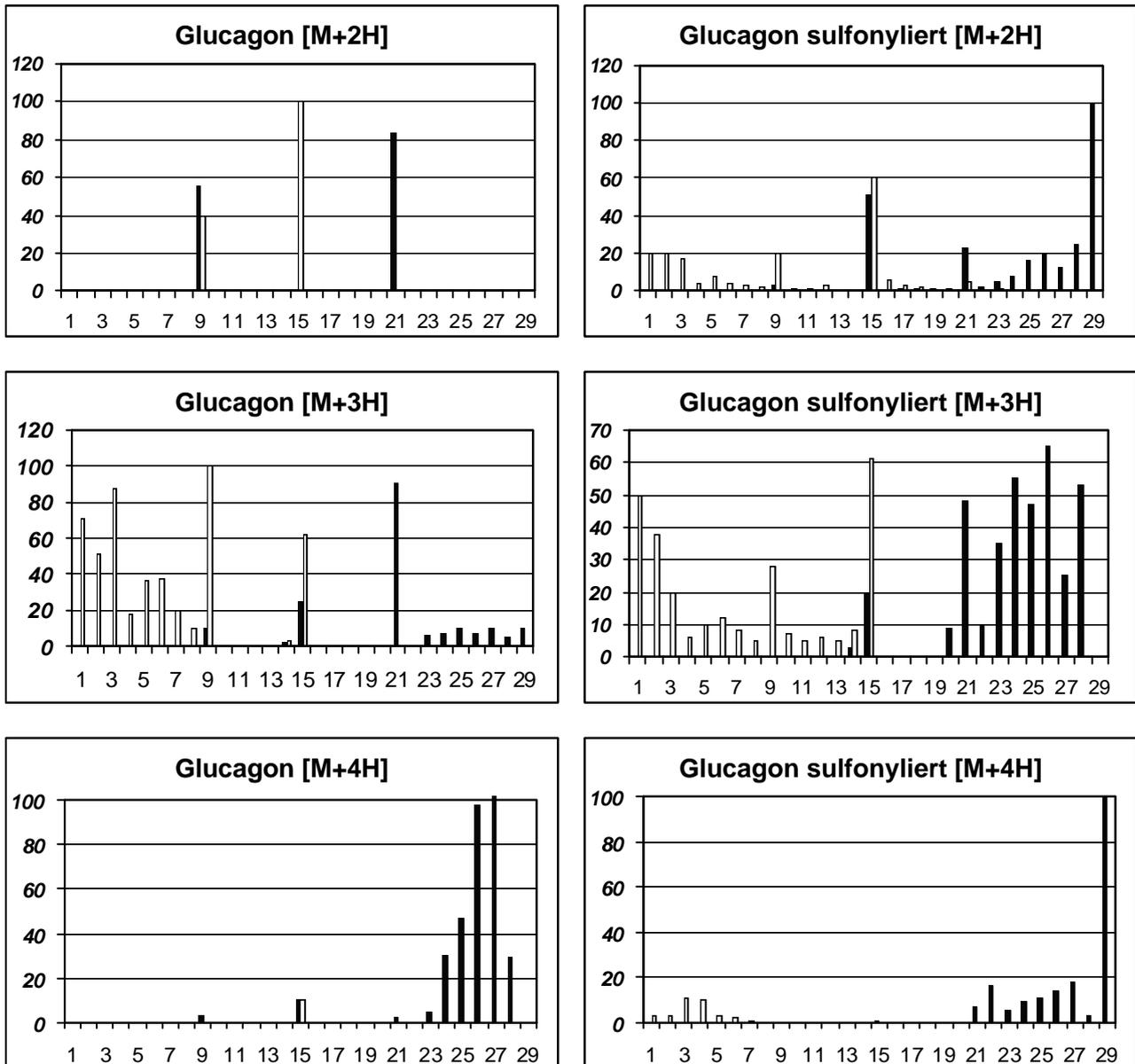


Abbildung 115: Vergleich der Fragmentierungen von Glucagon und sulfonyliertem Glucagon; das Ion mit 100% relativer Intensität bei Glucagon sulfonyliert [M+3H] (rechts unten) ist der Verlust der Sulfonsäuregruppe (siehe 5.5.5.2).

Für den Ladungszustand +4 wird, wie für die beiden anderen Ladungszustände, eine Fragmentierung in der Nähe des N-Terminus beobachtet, der durch die Verschiebung des mobilen Protons dorthin ermöglicht wird. Die Intensitäten dieser Fragment-Ionen sind recht gering, was aber mit dem intensiven  $b_{29}^{4+}$ -Fragment-Ion zusammenhängt. Die beim underivatisierten (und beim

acetylierten) Glucagon beobachtete Verschiebung des mobilen Protons auf den C-Terminus wird durch die Sulfonylierung nicht beeinflusst.

## 5.6 ROS-Peptid (Rhodopsin-Outer-Segment-Peptid)

Dieses 19 Aminosäuren lange Peptid stammt aus den äußeren Segmenten des beim Sehprozess primär phosphorylierten Rhodopsins. Das phosphorylierte Rhodopsin wird aus Kuhaugen präpariert<sup>126</sup>. Durch einen Verdau mit Asp-N Endoproteinase wird die äußere flexible Peptidkette (ROS-Peptid) des Membranproteins abgeschnitten. Die Analyse des Peptids, dessen Sequenz (DDEASTTVSK<sup>10</sup>TETSQVAPA) bekannt war, sollte die Phosphorylierungsstellen aufklären<sup>127</sup>. Für die Analyse des Fragmentierungsverhaltens sind die Position des Lysinrestes an Position 10 in der Peptidkette sowie ein Prolinrest in der Nähe des C-Terminus (Position 18) von Bedeutung. Der Einfluss der Phosphorylierung auf das Fragmentierungsverhalten sollte untersucht werden.

### 5.6.1 Fragment-Ionenspektrum des unphosphorylierten ROS-Peptids

Das Tochter-Ionenspektrum wird dominiert durch den Bindungsbruch am Prolin. Als Basispeak ( $m/z$  876.1) entsteht das doppelt geladene  $b_{17}^{2+}$ -Fragment. Daneben kommt auch ein einfach geladenes  $b_{17}^+$ -Fragment ( $m/z$  1751.0) vor, was durch einen *charge-separation* Mechanismus entstanden ist. Lysin als Stelle der höchsten Basizität ist in der Mitte des Peptids lokalisiert. Die

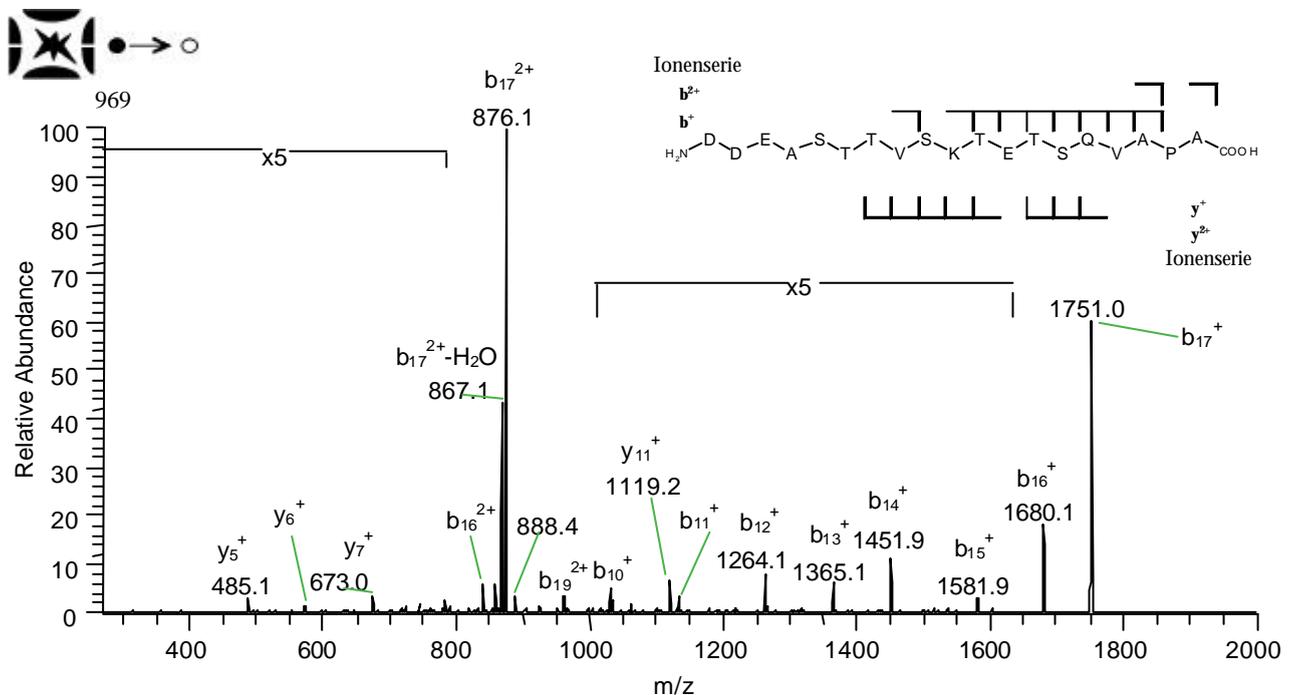


Abbildung 116: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des unphosphorylierten ROS-Peptids.

Serie der einfach geladenen b-Ionenfragmente ( $b_{17}^+$  bis  $b_{10}^+$ ) ist von geringer Intensität, kann aber zur Identifizierung des C-Terminus genutzt werden, da das Signal-Rausch Verhältnis gut ist.

Weitere b-Fragment-Ionen werden nicht gefunden, was darauf schließen lässt, dass eine starke Ladungslagerung am Lysin dafür sorgt, dass Ladungen nicht in die Nähe des N-Terminus gelangen, bzw. nicht nach der Fragment-Ionenbildung dort verbleiben. Einfach geladene y-Fragment-Ionen ( $y_{14}^+$  bis  $y_8^+$ ) sind ebenfalls intensitätsschwach. Der Hauptfragmentierungsweg ist der Bindungsbruch vor Prolin. Weitere Fragmentierungen finden nur im C-terminalen Bereich statt. Dabei kommt es zur Aufteilung der Ladungen auf die y- und b-Fragmente.

### 5.6.2 Fragment-Ionenspektrum des zweifach phosphorylierten ROS-Peptids

Die zweifache Phosphorylierung bewirkt eine Massen-Verschiebung um 80 Da pro Phosphatgruppe, so dass im MS<sup>2</sup>-Experiment das zweifach geladene Vorläufer-Ion ( $m/z$  1049) fragmentiert wird. Die phosphorylierten Aminosäuren tragen durch die Phosphatgruppe eine negative Ladung.

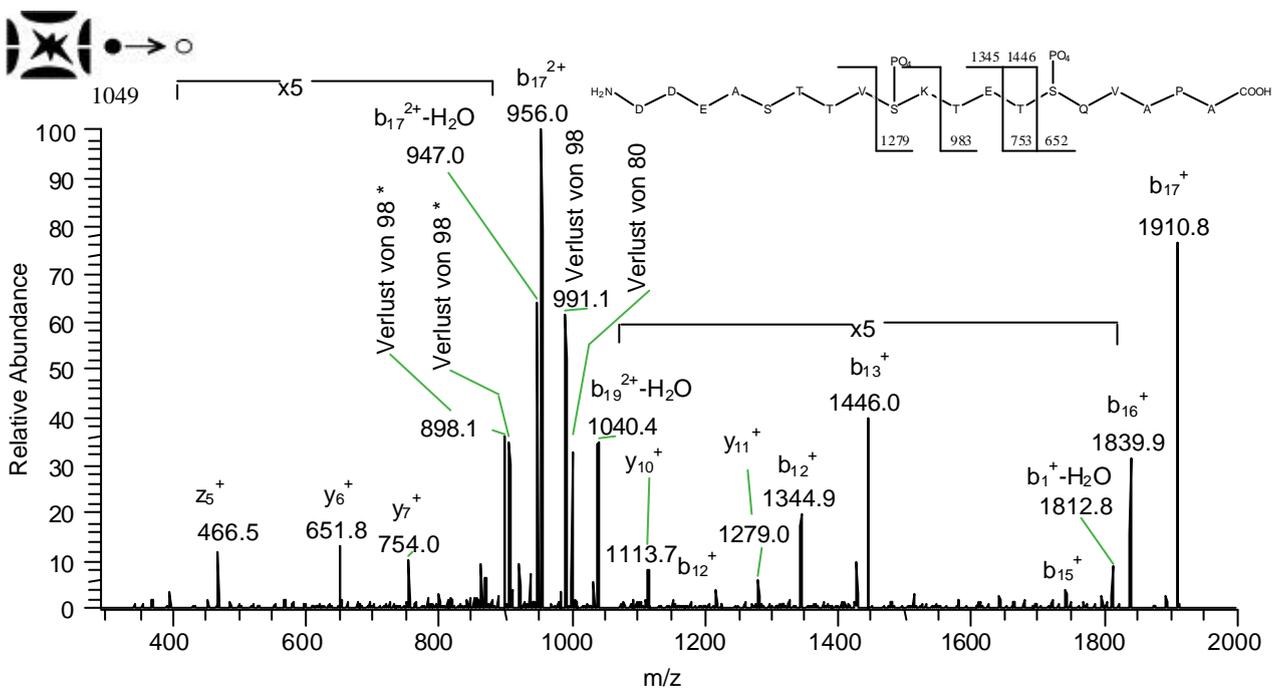


Abbildung 117: ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des zweifach phosphorylierten ROS-Peptids; Die Verluste von HPO<sub>3</sub> (80) und H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (98) sind aus dem Vorläufer-Ion ( $m/z$  1049) entstanden; Die mit \* gekennzeichneten Verluste von H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> stammen aus dem b<sub>17</sub><sup>2+</sup> bzw. b<sub>17</sub><sup>2+</sup>-H<sub>2</sub>O Fragment-Ion. Die in der Sequenz markierten Fragmente geben die Fragment-Ionen, die den Einbau des Phosphats an Serin 9 und 14 belegen.

Aus dem Fragment-Ionenspektrum müssen zunächst die derivatisierten Aminosäuren bestimmt werden. Aus dem zweifach geladenen Vorläufer-Ion lassen sich Phosphorsäureverluste ( $\Delta m = 98$  bzw.  $\Delta m = 49$ ) beobachten (2.6.2 Phosphorylierung). Aus dem Vorläufer-Ion ( $1049 \Rightarrow 1000.2$ ) wie auch aus dem Hauptfragment b<sub>17</sub><sup>2+</sup> ( $956.2 \Rightarrow 907.3$ ) wird ein Neutralverlust von Phosphorsäure

( $\Delta = 49$ ) detektiert. Somit könnte auch bei einem unbekanntem Peptid auf das Vorhandensein von Phosphorylierungen geschlossen werden.

Das Peptid besitzt acht (drei Ser und fünf Thr) potentielle Phosphorylierungsstellen. Durch die Serie der einfach geladenen b-Fragment-Ionen lässt sich Serin an Position 14 als Phosphorylierungsstelle nachweisen. Das Fragment-Ion  $b_{14}^+$  fehlt zwar, dafür sind  $b_{13}^+$  und  $b_{12}^+$  nur noch einfach phosphoryliert, so dass Threonin an Position 13 nicht phosphoryliert sein kann, da die Differenz zwischen beiden Ionen der normalen Residuenmasse von Threonin (101 Da) entspricht.

Bestätigt werden diese Befunde durch die einfach geladenen y-Fragmente  $y_6^+$  (m/z 652) und  $y_7^+$  (m/z 753), die jeweils noch einen Phosphatrest besitzen. Mit der Masse 1279 wird noch ein Fragment-Ion detektiert, welches einem  $y_{11}^+$ -Fragment mit einem um 160 Da (entsprechend zwei Phosphatresten) erhöhtem m/z Verhältnis entspricht. Ein  $y_5^+$ -Fragment (m/z 485) konnte nicht detektiert werden. Statt dessen wird ein  $z_5^+$ -Fragment (m/z 466.1, siehe Abbildung 117 und Abbildung 118) gefunden, was eine Massendifferenz von 186 Da zum  $y_6^+$ -Fragment aufweist. Dies entspricht einem Verlust von Ser (87 Da), Phosphorsäure (98 Da) und einem Wasserstoffatom. Damit sind die beiden Phosphorylierungsstellen (Ser 9 und Ser 14) bestimmt worden.

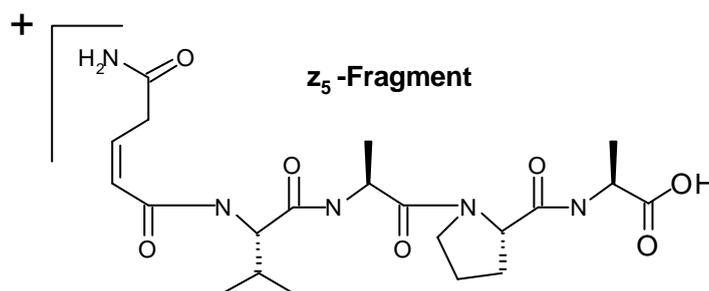


Abbildung 118: Bei der Fragment-Ionenbildung neben Ser (phosphoryliert) entsteht ein  $z_5^+$ -Fragment.

Die relativ intensive Fragmentierung N-terminal zum phosphorylierten Serin ( $b_{13}^+$  und  $b_{12}^+$ ) kann mit der negativen Ladung des Phosphatrestes in Verbindung gebracht werden (siehe Abbildung 119). Das Fragment-Ion  $b_{14}^+$  fehlt. Die Vorläufer-Ionen mit einem mobilen Proton weisen eine erhöhte Aufenthaltswahrscheinlichkeit im Bereich des phosphorylierten Serins auf, was zur intensiveren Fragmentierung unter Ladungstrennung (*charge-separation*) führt. Dies wird durch die ebenfalls erhöhte Intensität der korrespondierenden y-Fragmente ( $y_6^+$  und  $y_7^+$ ) bzw. des  $z_5^+$ -Fragmentes bestätigt.

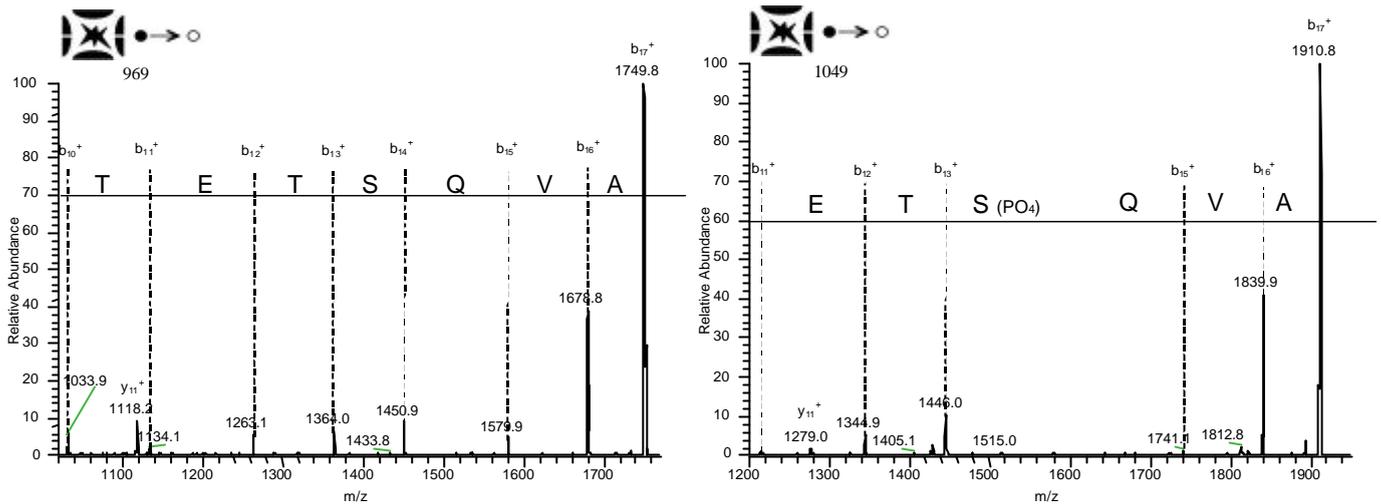


Abbildung 119: Vergrößerter Ausschnitt aus den ESI-MS<sup>2</sup>-Spektren des ROS-Peptids; links unphosphoryliert, rechts phosphoryliert, Intensivierung der Fragmentierung durch Phosphateinbau.

### 5.6.3 Fragmentierungsverhalten des phosphorylierten und N-terminal acetylierten ROS-Peptids

Die Acetylierung des N-Terminus wirkt sich nicht auf das Tochter-Ionenspektrum des Peptids aus. Vermutlich ist der N-Terminus bei zwei Ladungen nicht ein Ort bevorzugter Ladungslokalisierung, so dass eine Acetylierung keinen direkten Einfluss auf das Fragmentierungsverhalten des Peptids hat. Da höhere Ladungszustände nicht beobachtet wurden, kann davon ausgegangen werden, dass der N-Terminus nur sehr schwer zu protonieren ist. Möglicherweise liegt eine intraionische Wechselwirkung mit einer der freien sauren Aminosäuren (Asp oder Glu) vor.

## 6 Diskussion der Ergebnisse

### 6.1 Selektivität und Nebenreaktionen bei Derivatisierungen

Grundlage für die Untersuchung von Derivatisierungsreaktionen an basischen Zentren ist die Vermeidung von Nebenreaktionen, da diese die Interpretation von Spektren verkomplizieren können.

Die Thiolgruppe des freien Cysteins als starkes Nucleophil konkurriert mit den Aminogruppen des N-Terminus und des Lysins. Daher werden Cysteine standardmäßig durch reduktive Alkylierung als potentielle Orte für Nebenreaktionen ausgeschlossen. Gleichzeitig werden Disulfidbrücken aufgebrochen, um eine Linearisierung der Peptide zu erreichen. Als Ausgangssubstanzen für Derivatisierungen an basischen Zentren sind daher immer reduktiv alkylierte Peptide einzusetzen.

Bei der reduktiven Alkylierung hat sich 4-Vinylpyridin als wenig geeignet gezeigt, da es bei der Durchführung von MS<sup>2</sup>-Experimenten instabil ist. Es entstehen ausschließlich Ionen, die durch eine Abspaltung der eigentlichen Schutzgruppe entstanden sind (Spektren nicht gezeigt). Zuverlässig und mit guten Ausbeuten funktioniert die Alkylierung mit Iodacetamid bzw. Iodessigsäure (siehe 5.2). Es konnte gezeigt werden, dass im Fragmentierungsverhalten keine Unterschiede auftreten, obwohl zumindest durch die Carboxylatgruppe des Iodessigsäure-Derivats eine potentielle negative Ladung eingeführt wird. Diese führt bekanntlich bei Aspartat zu besonders intensiven Fragmentierungen (siehe 5.1.2.2).

Bei den untersuchten Acylierungsmethoden treten Nebenreaktionen (z. B. Überacylierungen) an Serin oder Threonin nur in geringem Maße auf. Für die Durchführung einer Acylierung an einer reinen Substanz ist dies nicht problematisch, da über die Massenselektion die Ionen der erwarteten Molekülmasse mit der Ionenfalle isoliert werden können. Problematisch wird es bei größeren Substanzgemischen, die chromatographisch aufgetrennt werden. Dort kann es zu Überlagerungen von Elutionspeaks bei der Chromatographie kommen.

Unvollständige Derivatisierungen (einfache Derivatisierung bei mehreren basischen Stellen) sind schwierig zu interpretieren, da sie bezüglich des Derivats zu Stellungsisomeren führen können, die unterschiedliche Fragment-Ionen ergeben.

Für die Durchführung von Derivatisierungen ist es daher wichtig, die möglichen Nebenreaktionen zu kennen und bei der Auswertung der Daten zu berücksichtigen. Versuche, selektiv den N-Terminus oder das Lysin zu derivatisieren, funktionieren nur teilweise<sup>128</sup>. Nach den bisherigen Versuchen sind selektive Derivatisierungen schwierig zu realisieren, da zu geringe Mengen an Peptid eingesetzt werden, so dass die molaren Verhältnisse nicht exakt eingestellt werden können.

Bei Auftreten von Stellungsisomerien ist eine Charakterisierung des Substanzgemisches über HPLC-MS notwendig, wie Derivatisierungsversuche von Angiotensin II mit *para*-Bromphenacylbromid gezeigt haben (Spektren nicht gezeigt). Dort entstand ein isomeres Substanzgemisch, bei dem zum einen eine Derivatisierung des N-Terminus und zum anderen eine Derivatisierung an Histidin stattgefunden hat.

## 6.2 Einfluss von Derivaten an basischen Zentren auf das Fragmentierungsverhalten

### 6.2.1 Verringerung der Basizität durch Acylierung

Durch Acylierung (Acetylierung, Derivatisierung mit Brom-Nikotinsäure, Succinylierung und auch durch Sulfonylierung) der basischen Zentren wird deren Basizität herabgesetzt. Die Lokalisierung einer positiven Ladung an den derivatisierten Gruppen wird verhindert, wodurch die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des mobilen Protons auf dem Peptidrückgrat vergrößert wird. Bei einigen untersuchten Peptidderivaten wird dadurch auch der maximale Protonierungsgrad vermindert (siehe 5.4.3).

Bei der Acetylierung von Angiotensin I ist die Intensität des maximalen Ladungszustandes +3 gegenüber dem underivatisierten Peptid stark erhöht, obwohl der N-Terminus eine verminderte Basizität besitzt. Das Peptid besitzt mit einem Arginin und zwei Histidinen dennoch genügend Protonierungsstellen. Durch die Acetylierung des Angiotensin I sind die Intensitäten der vorher intensitätsschwachen Fragmente gegenüber den dominanten Fragment-Ionen verbessert.

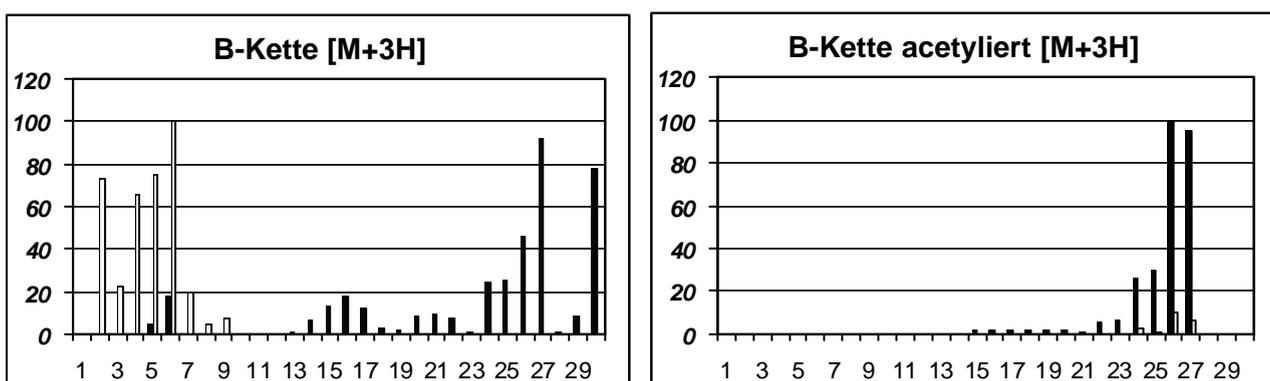


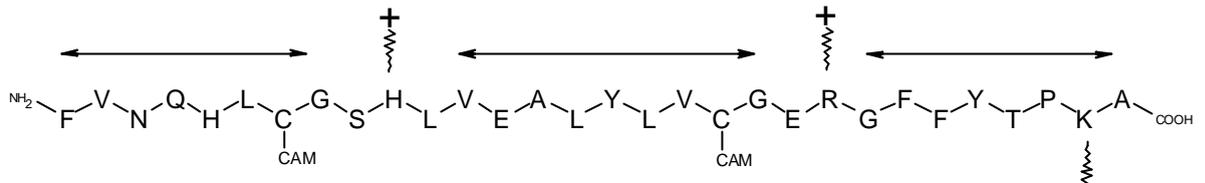
Abbildung 120: Vergleich der Fragment-Ionen-Intensitäten von underivatisierter und acetylierter B-Kette des Rinder-Insulins; Durch die Acetylierung ist die Bildung von  $\gamma$ -Fragment-Ionen im N-terminalen Bereich des Peptids komplett unterdrückt worden.

Die am N-Terminus und am Lysin acetylierte B-Kette des Rinder-Insulins zeigt im Ladungszustand +3 als Verbesserung gegenüber dem Spektrum der underivatisierten B-Kette eine

ausschließliche Bildung von mehrfach geladenen b-Fragment-Ionen (siehe Abbildung 120). Es entstehen lediglich einfach geladene y-Fragmente des C-Terminus. Für den Ladungszustand +2 kann eine verbesserte Fragmentierung in der Mitte des Peptids beobachtet werden.

Die Acylierung der B-Kette des Rinder-Insulins mit Brom-Nikotinsäure zeigt die gleichen Fragment-Ionen wie die acetylierte Form (siehe 5.4.5). Die bei der underivatisierten B-Kette des Rinder-Insulins beobachtete Fragmentierung des N-Terminus wird komplett unterdrückt.

#### B-Kette von Rinder-Insulin, underivatisiert



#### B-Kette von Rinder-Insulin, acetyliert

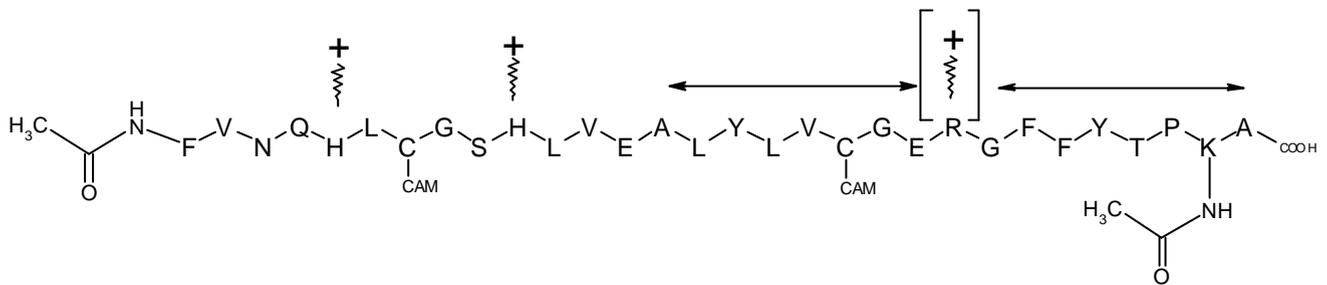


Abbildung 121: Protonierungsschema für die B-Kette des Rinder-Insulins (underivatisiert und nach Acetylierung); Die Doppelpfeile symbolisieren die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des mobilen Protons; Die Protonierung an Arginin nach Acetylierung ist eine lokalisierte Ladung, weil kleinere b-Fragment-Ionen nur mit geringer Intensität im Ladungszustand +2 auftreten. Ein Teil der Ladung ist als mobiles Proton auf beiden Seiten des Arginins zu finden.

Bei der Acetylierung der A-Kette des Rinder-Insulins ist dieser Effekt nicht aufgetreten. Da die A-Kette nur eine basische Stelle (nämlich den N-Terminus) aufweist, ist die Einflussnahme auf das Fragmentierungsverhalten durch die Acetylierung weitaus geringer als bei anderen Peptiden (z. B. der B-Kette des Rinder-Insulins). Statt dessen wird ein spezifischer Bindungsbruch beobachtet. Durch die Reaktion mit dem N-Terminus des Peptids wird eine Stabilisierung der negativen Ladung am Glutamat durch den N-Terminus verhindert. Die Carboxylatgruppe überträgt nun ein Proton auf die Peptidkette, was zu dem spezifischen Bindungsbruch N-terminal zu Glutamat führt.

Die Acetylierung des Glucagons bewirkt in allen Ladungszuständen eine verbesserte Fragmentierung des C-Terminus. Der Einfluss des Ladungszustandes auf die Bildung von y-Fragment-Ionen ist dabei größer als der Einfluss der Acetylierung. So lässt sich für den Ladungszustand +3 sowohl im underivatisierten als auch im acetylierten Glucagon eine intensive Fragmentierung des N-Terminus unter Ausbildung von y-Fragment-Ionen beobachten (siehe 5.3.3).

### 6.2.2 Einführung einer positiven Ladung über Phosphonium-Salze

Die in der Literatur beschriebenen Derivatisierungsreaktionen mit Phosphonium-Salzen<sup>99 100</sup> sollen die Fragmentierung durch die zusätzliche Ladung verbessern. Durch Alkylierung mit Brom-Ethyl-Triphenylphosphin (Br-TPP) wird am N-Terminus sowie am Lysin eine feste positive Ladung auf das Peptid gebracht.

Durch die zusätzliche Ladung kann der maximale Ladungszustand der B-Kette des Rinder-Insulins auf +6 erhöht werden. Das Derivat erweist sich allerdings als instabil bei niedrigen Ladungszuständen (+2 und +3), so dass keine Sequenzinformation gewonnen werden kann. Auch bei einer Derivatisierung von Angiotensin II mit Br-TPP wird die Abspaltung des Derivats beobachtet (nicht gezeigt). Bei zweifacher Derivatisierung (N-Terminus und Lysin) der B-Kette (Bis-TPP-Derivat) ergibt sich stets ein Verlust der Derivatisierungsgruppe, der sich besonders gut durch die Bildung des Fragmentes 289 (EI-TPP) verfolgen lässt. Erst bei höheren Ladungszuständen zeigt sich eine Fragmentierung, die das Derivat am C-Terminus trägt. Somit wird durch eine erhöhte Ladungsdichte die Eliminierungsreaktion zurückgedrängt. Die fixierte Ladung impliziert, dass die verbesserte Fragmentierung nach einem *charge-remote* Mechanismus abläuft.

Durch die fixierten Ladungen der Phosphonium-Derivate am N-Terminus und am Lysin (Bis-Derivat) kann eine verstärkte Fragmentierung im mittleren Bereich der B-Kette und am C-Terminus beobachtet werden, sobald eine genügend hohe Ladungsdichte auf dem Peptid erreicht wird<sup>XX</sup>. Durch die fixierten Ladungen wird das verbleibende mobile Proton in die Mitte des Peptids geschoben, um dort für eine verbesserte Fragmentierung zu sorgen. Dieses Verhalten zeigt sich auch schon beim N-terminal derivatisierten Mono-Derivat der B-Kette.

Am Beispiel der Derivatisierung der A-Kette von Insulin mit Br-TPP lässt sich beobachten, dass durch die zusätzliche Ladung am N-Terminus die Stabilität der b-Fragment-Ionen erhöht wird. Es bilden sich verstärkt zweifach geladene b-Fragmente, die den C-Terminus charakterisieren. Durch die erhöhte Stabilität können kleine b-Fragmente zur Charakterisierung des N-Terminus beobachtet werden.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Einführung einer weiteren fixierten Ladung die Fragmentierung an den Enden der Peptidkette nicht generell fördert. Statt dessen wird die Aufenthaltswahrscheinlichkeit für das freie Proton in der Mitte des Peptids erhöht. Eine Beeinflussung ist also möglich. Die ursprüngliche Zielsetzung durch die Derivatisierung mit Br-TPP eine verstärkte Fragmentierung im Bereich des N-Terminus zu erhalten, konnte nicht beobachtet werden. Außerdem ist das Derivat in der Gasphase bei niedrigen Ladungszuständen instabil.

---

<sup>XX</sup> Bei niedrigen Ladungszuständen des Vorläufer-Ions überwog die Eliminierungsreaktion der Derivatgruppe.

### 6.2.3 Einführung einer negativen Ladung

Die Einführung einer negativen Ladung durch Derivatisierung mit Chlor-Sulfonylacetyl-Chlorid (CSAC) am N-Terminus soll das Fragmentierungsverhalten beeinflussen und die Intensität der Fragment-Ionen im Bereich des N-Terminus erhöhen.

Für Angiotensin I (Ladungszustand +1 und +2) und Angiotensin II (Ladungszustand +1, nicht gezeigt) werden Spektren mit einer gleichmäßigen Verteilung der Ionen-Intensitäten beobachtet. Durch die negative Ladung am N-Terminus wird die dominierende Fragmentierung durch Aspartat ( $y_9^+$ -Fragment) vermindert. Die Ladungslokalisierung am Arginin ist verringert worden; statt dessen bewegen sich die Protonen bzw. im einfachen Ladungszustand das einzelne Proton frei auf dem Peptidrückgrat, was zu einer gleichmäßigen Bildung von Fragment-Ionen führt. Lediglich das Prolin übt jetzt noch einen Einfluss auf das Spektrum aus, indem es im Ladungszustand +2 zu einer Ladungstrennung führt.

Die Sulfonylierung der B-Kette des Rinder-Insulins zeigt, dass sich die Fragmentierung im N-terminalen Bereich verbessern lässt. Allerdings ist diese Verbesserung stark vom Ladungszustand abhängig, da durch den erhöhtem Protonierungsgrad wiederum der Einfluss der Protonen auf das Spektrum zunimmt. Die Sulfonylierung kann nicht mehr entscheidend das Spektrum beeinflussen. Durch das Bis-Derivat konnte ein Teil der mobilen Protonen wieder auf den C-Terminus zurückgezogen werden, so dass sich die Derivatisierungseffekte gegenseitig nahezu aufheben.

Die Derivatisierung des Glucagons zeigt, dass die negative Ladung eine Identifizierung des N-Terminus bereits aus dem Ladungszustand +2 heraus ermöglicht (siehe 5.5.5.1). Es konnte gezeigt werden, dass durch die negative Ladung des Derivats mobile Protonen auf dem Peptidrückgrat entstehen, die zu intensiver Fragmentierung des N-Terminus führen. Das gleichzeitige Auftreten von Fragmentierungen im C-terminalen Bereich kann nur darüber erklärt werden, dass die Delokalisierung des mobilen Protons nicht ausschließlich durch die Sulfonylierung beeinflusst wird. Ein Teil der Ladung verbleibt demnach am C-Terminus. Für den Ladungszustand +3 sind die durch das mobile Proton verursachten Fragmentierungen in ihrer relativen Intensität erhöht, was durch das dritte verfügbare Proton und die Sulfonylierung ermöglicht wird.

Die Fragmentierungen des Ladungszustandes +4 von Glucagon zeigen deutlich den Einfluss der Derivatisierung mit CSAC. Im Ladungszustand +4 des underivatisierten Glucagon werden ausschließlich Fragmentierungen im C-terminalen Bereich beobachtet. Die Aufenthaltswahrscheinlichkeit für das mobile Proton beschränkt sich aufgrund der Protonierung der basischen Zentren auf den C-terminalen Bereich.

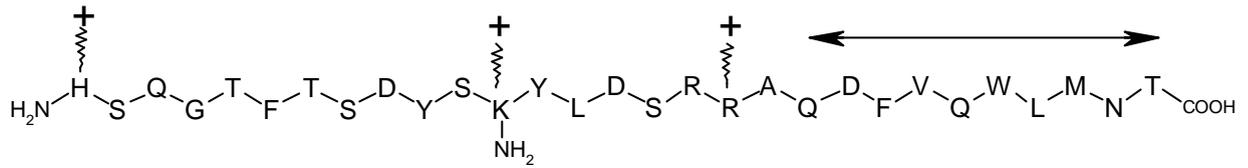
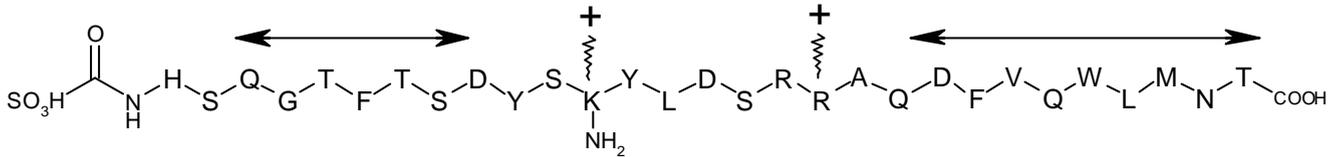
**Glucagon, underivatisiert****Glucagon, sulfonyliert**

Abbildung 122: Protonierungsschema des Ladungszustandes +4 von underivatisiertem Glucagon und von sulfonyliertem Glucagon; Die lokalisierte Ladung ist an den basischen Zentren durch ein +gekennzeichnet. Die Doppelpfeile symbolisieren die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des mobilen Protons, wie sie aufgrund der Fragment-Ionenbildung angenommen werden kann.

Durch die Coulombabstoßung des protonierten Histidins (oder des N-Terminus) und des Lysins (Position 12) ist ein Aufenthalt des mobilen Protons im N-terminalen Bereich nicht mehr möglich. Durch die Sulfonylierung wird die Basizität des N-Terminus verringert und eine negative Ladung eingeführt, so dass durch ein mobiles Proton Fragmentierungen stattfinden können (siehe Abbildung 122).

Insgesamt wird durch die Einführung einer negativen Ladung das Fragmentierungsverhalten mehrfach geladener Molekül-Ionen am nachhaltigsten beeinflusst. Dabei hat die zweifache Derivatisierung der B-Kette des Rinder-Insulins gezeigt, dass sich die Effekte der negativen Ladung auf das mobile Proton auch gegenseitig aufheben können.

### 6.3 Markierung von Fragment-Ionen mit stabilen Isotopen

Die Derivatisierung mit aktivierter Brom-Nikotinsäure (BrNA) als Isotopenlabel wird auf ihre Anwendbarkeit untersucht.

Bei der Derivatisierung der B-Kette des Rinder-Insulins werden sowohl der N-Terminus als auch das Lysin mit Brom-Nikotinsäure derivatisiert. Das Fragmentierungsverhalten ähnelt dem der acetylierten B-Kette des Rinder-Insulins. Aus dem Ladungszustand +3 bilden sich ausschließlich b-Fragment-Ionen, die durch Fragmentierung im C-terminalen Bereich entstanden sind.

Da das Lysin ebenfalls mit BrNA derivatisiert ist, können die korrespondierenden kleinen y-Fragment-Ionen über das Isotopenmuster einwandfrei identifiziert werden. Kleine b-Fragmente, die nach der Derivatisierung ebenfalls einen Isotopenlabel besitzen, können nicht identifiziert werden, was aber dem Einfluss der Acylierung des N-Terminus durch Brom-Nikotinsäure

zugeschrieben wird. Für die übrigen b-Fragmente wird die erwartete Erhöhung der Masse der Fragment-Ionen (*mass shift*) festgestellt. Das charakteristische Isotopenmuster konnte im Ladungszustand +2 nicht aufgelöst werden. Somit ist der Abstand von 2 Da für mehrfach geladene Ionen ungeeignet, da er durch Kohlenstoff  $^{13}\text{C}$  Isotopen überlagert wird.

Bei kleineren Peptiden wie Angiotensin II (m/z 1046) oder Angiotensin I (m/z 1297) lässt sich die Markierung der Ionen über das Isotopenmuster des Broms einwandfrei (MALDI-PSD Spektren, aber auch in ESI-MS<sup>n</sup>-Spektren) identifizieren.

## 6.4 Protonierungsgrad von Peptiden

Der maximale Protonierungsgrad eines Peptids ist Thema vieler Forschungsarbeiten. Erste Ansätze die Phänomene zu erklären<sup>37</sup> kamen über die Ladungsdichte in den Tropfen vor der Verdampfung (ESI-Ionisation, CRM-Modell). Experimentelle Arbeiten mit Arginin-haltigen Peptiden<sup>129</sup> zur Ermittlung des maximalen Protonierungsgrades wurden durch Modelle zur theoretischen Vorhersage<sup>130</sup> ergänzt bzw. nachvollzogen. Demnach kann über die Gasphasen Protonen Transfer Reaktivität der maximale Ladungszustand modelliert werden. Als grobe Abschätzung (empirische Formel) gilt die Anzahl der in Lösung protonierten basischen Zentren<sup>131</sup>, da sie gegenüber den übrigen Amidprotonen eine erhöhte Basizität besitzen<sup>132</sup>. Dieses Modell ist auf Peptide und kleinere Proteine anwendbar, versagt aber bei größeren Proteinen, die deutlich mehr basische Zentren besitzen. Hier wird der maximale Ladungszustand über die relativen Gasphasen Basizitäten bestimmt<sup>133</sup>, die berücksichtigen, dass die Proteine in der Gasphase noch eine gewisse 3D-Struktur besitzen, innerhalb derer Salzbrücken ausgebildet sind.

In der folgenden Tabelle sind die nach der empirischen Formel zu erwartenden maximalen und die tatsächlich gefundenen Ladungszustände mehrerer untersuchter Peptide gegenüber gestellt.

*Tabelle 7: Theoretische ( $LZ_{theor}$ ), experimentell beobachtete ( $LZ_{exp}$ ), und maximale ( $LZ_{max}$ ) Ladungszustände der untersuchten Peptide. Die in Klammern stehenden maximalen Ladungszustände stammen aus Literaturspektren, Mellitin wurde synthetisiert und besitzt am C-Terminus keine Carboxylatgruppe, sondern ein Säureamid, das nur eingeschränkt ein basisches Zentrum darstellt. Das Synthetische Peptid (Syn. Peptid) wurde als Modellpeptid ebenfalls untersucht.*

Peptid	AS	basische Zentren	$LZ_{theor}$	$LZ_{exp}$	$LZ_{max}$
Angiotensin I	10	NH <sub>2</sub> , Arg, 2 His	4	1, 2, 3	3 (4)*
A-Kette von Insulin	21	NH <sub>2</sub>	1	2, 3	3
B-Kette von Insulin	30	NH <sub>2</sub> , 2 His, Arg, Lys	5	2, 3, 4, 5	5
Intaktes Insulin	51	2 NH <sub>2</sub> , 2His, Arg, Lys	6	3, 4, 5	5
Glucagon	29	NH <sub>2</sub> , His, Lys, 2Arg,	5	2, 3, 4	4
ROS-Peptid	17	NH <sub>2</sub> , Lys	2	1, 2	2
Syn. Peptid (nicht gezeigt)	19	NH <sub>2</sub> , Lys	2	1, 2	2
Bradykinin	9	NH <sub>2</sub> , Arg, Arg,	3	1,2	2 (3)*
Mellitin <sup>134</sup>	24	NH <sub>2</sub> , Lys, (KRK), (NH <sub>2</sub> )	5 (+1)	(3, 4, 5, 6)	(6)*

Daraus geht hervor, dass nur für Peptide, die basische Aminosäuren enthalten, die Vorhersagen annähernd richtig sind. In der Literatur ließ sich für Angiotensin I noch ein Ladungszustand 4+ finden<sup>77</sup>. Bei Messungen am LCQ ist dieser Ladungszustand jedoch nicht aufgetreten. Daraus lässt sich schließen, dass die Ionisierung in der Quelle einen Einfluss auf den Protonierungsgrad ausübt. Zusätzlich könnte durch die unmittelbare Nachbarschaft der Protonierungsstellen eine vierfache Protonierung durch Coulombabstoßung erschwert sein.

Ebenfalls zu niedrig ist der maximale Protonierungsgrad für Glucagon. Aus den Ergebnissen, die für Arginin-haltige Peptide<sup>130</sup> gefunden wurden, geht allerdings hervor, dass bei zunehmender Anzahl basischer Zentren in den Peptiden nicht alle potentiellen Protonierungsstellen tatsächlich eine positive Ladung besitzen. So ist für das Peptid (RRGG)<sub>3</sub> nur ein maximaler Ladungszustand +5 gemessen worden, obwohl theoretisch sieben basische Zentren für eine Protonierung in dem Peptid zur Verfügung stehen. Vermutlich liegen die Arginine zu dicht nebeneinander, so dass eine vollständige Protonierung nicht erreicht werden kann. Für Glucagon ist der Ladungszustand +4 als maximaler Protonierungsgrad ebenfalls erklärbar durch die unmittelbare Nachbarschaft der beiden Arginin-Reste in Position 17 und 18.

Die A-Kette des Rinder-Insulins, die mit dem N-Terminus nur ein einziges basisches Zentrum besitzt, weist einen maximalen Protonierungsgrad von drei auf. Sogar nach Acetylierung des N-Terminus lassen sich noch dreifach geladene Molekül-Ionen detektieren. Hier erfolgt die Protonierung ausschließlich auf dem Peptidrückgrat. Die Protonen sind somit nicht auf die basischen Zentren als Protonierungsstellen festgelegt, sondern können auch auf die Peptidkette ausweichen. Die ausschließliche Protonierung der underivatisierten A-Kette des Rinder-Insulins auf dem Peptidrückgrat führt zu gleichmäßiger und intensiver Fragment-Ionenbildung im zweifachen Ladungszustand.

## **6.5 Einfluss des Protonierungsgrades auf das Fragmentierungsverhalten mehrfach geladener Vorläufer-Ionen**

Bei den untersuchten mehrfach geladenen Peptiden können sowohl die underivatisierten (bzw. alkylierten) Peptide sowie deren Derivate hinsichtlich ihres Fragmentierungsverhaltens bei unterschiedlichen Ladungszuständen betrachtet werden. Zu berücksichtigen sind dabei die Anzahl der basischen Aminosäuren im Peptid und der Ladungszustand des Vorläufer-Ions. Im einfachsten Fall liegt ein N-Terminus als basische Stelle im Peptid vor.

Die A-Kette des Rinder-Insulins zeigt für den Ladungszustand +2 eine intensive Fragmentierung, die in etwa zu gleichen Teilen aus  $\gamma$ - und  $\beta$ -Fragmenten besteht. Bei der *charge-site-induced*

Fragmentierung geschieht der Bindungsbruch unter Bildung von geladenen  $\gamma$ -Fragmenten. Da nur wenige zweifach geladene Fragment-Ionen entstehen, kann davon ausgegangen werden, dass die Ladung am N-Terminus lokalisiert ist, während die zweite Ladung auf dem Peptidrückgrat als mobiles Proton die Bindungsbrüche einleitet und anschließend auf dem  $\gamma$ -Fragment lokalisiert wird. Im Ladungszustand +3 treten bevorzugt die b-Fragmente als zweifach protonierte Ionen auf. Die Bindungsbrüche finden im C-terminalen Bereich statt, wobei die dritte Ladung sich auf den  $\gamma$ -Fragmenten wiederfindet. Obwohl es am anderen Ende des Peptids zur Bildung einfach geladener b-Fragment-Ionen kommt, lassen sich zweifach geladene  $\gamma$ -Fragment-Ionen nicht detektieren. Sie sind vermutlich instabil und zerfallen weiter zu kleineren  $\gamma$ -Fragmenten. Mit zunehmendem Ladungszustand findet nur noch eine Fragmentierung im C-terminalen Bereich der A-Kette statt.

Bei der B-Kette des Rinder-Insulins läßt sich dieselbe Tendenz beobachten. Mit fünf basischen Zentren lassen sich allerdings mehr Ladungen auf dem Peptid unterbringen, so dass hier der Ladungszustand +3 die intensiven Ionen beider Fragment-Ionenserien liefert. Mit zunehmendem Protonierungsgrad findet auch in der B-Kette nur noch eine Fragmentierung des C-Terminus statt.

Der Protonierungsgrad hat auch bei Glucagon einen starken Einfluss auf das Fragmentierungsverhalten. Im zweifachen Ladungszustand findet ausschließlich Fragmentierung durch die Aspartat-Residuen statt. Im dreifachen Ladungszustand wird eine gleichmäßige Fragmentierung an den Enden des Peptids beobachtet. Gleichzeitig werden die Bindungsbrüche am Aspartat nur noch mit verminderter Intensität detektiert. Für den Ladungszustand +4 wird ausschließlich Fragmentierung im C-terminalen Bereich beobachtet.

Von TANG et. al.<sup>77</sup> ist ein vergleichbares Peptid (HSDAVFTDNYTR) beschrieben worden. Das 12 Aminosäuren lange Peptid stammt aus einem tryptischen Verdau. Die zwei basischen Aminosäuren Histidin und Arginin, sowie der N-Terminus ergeben maximal eine dreifache Protonierung. Bei einfacher Protonierung dominiert die Fragmentierung neben Aspartat (bei Glucagon im Ladungszustand +2). Durch die zweite Ladung wird eine durchgehende Fragmentierung beobachtet. Im Ladungszustand +3 sind entweder der N-Terminus oder Histidin sowie das Arginin protoniert. Durch das dritte Proton entstehen bevorzugt Fragmente in der Mitte des Peptids (Phe, Thr). Durch die an den Enden fixierten Protonen ist die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des dritten Protons auf die Mitte des Peptids beschränkt und es kommt zu vermehrten Bindungsbrüchen.

Insgesamt lässt sich sagen, dass beim maximalen Protonierungsgrad des Peptids die Beweglichkeit der mobilen Protonen eingeschränkt wird. Bei mittleren Protonierungsgraden ist die Fragmentierung am intensivsten und es wird die meiste Sequenzinformation über das Protein erhalten.

## 6.6 Sequenzspezifische Einflüsse

### 6.6.1 Prolin-Effekt

Der Effekt eines bevorzugten Bindungsbruches N-terminal zum Prolinrest ist in vielen der untersuchten Peptide aufgetreten (Ang I und Ang II, ROS-Peptid, B-Kette des Rinder-Insulins). Dabei entsteht je nach Ladungszustand ein intensives b-Fragment (siehe auch Abbildung 124), was in der erhöhten Basizität des sekundären Amids am Prolin gegenüber den primären Amidien begründet ist<sup>135</sup>. Durch Erhöhung des Ladungszustandes des Vorläufer-Ions ist die Intensität des entsprechenden b-Fragmentes vermindert bzw. die Intensität der übrigen b-Fragmente erhöht.

Das Beispiel des Mellitins<sup>134</sup> zeigt ebenfalls deutlich Fragmentierungen neben Prolin, welches dort in der Mitte des Moleküls liegt. Trotz erhöhter Ladungszustände bleibt der Bindungsbruch dominant. Lediglich der Ladungszustand des entsprechenden Fragmentes ist erhöht worden, da sich drei basische Aminosäuren (KRK) in der Sequenz befinden.

Üblicherweise findet eine Fragmentierung C-terminal zum Prolin nicht statt<sup>136</sup>.

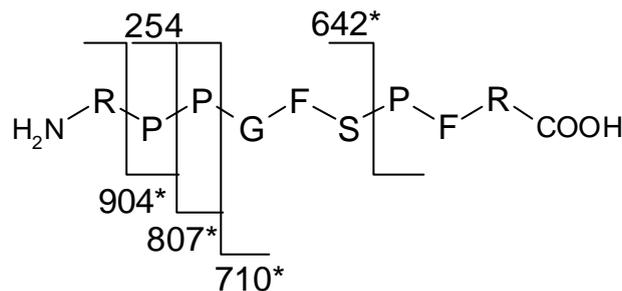


Abbildung 123: Fragment-Ionenbildung im Bradykinin zwischen zwei Prolinresten. Das  $b_2^+$ -Fragment konnte detektiert werden, sowie das  $y_7^+$ (807) und das  $y_6^+$ -Fragment (710). Die mit \* gekennzeichneten Ionen traten schon als Fragment-Ionen in der ESI-Quelle (in-source-fragmentation) auf.

Bradykinin (siehe Abbildung 123), das als Nonapeptid gleich drei Prolinreste enthält, bildet eine Ausnahme. Hier entstehen Fragmentierungen auch C-terminal vom Prolinrest. Das  $y_7^+$ -Fragment-Ion (m/z 807) ist durch eine Fragmentierung zwischen den beiden benachbarten Prolinresten entstanden. Der Einfluss der Instabilität der N-terminalen Prolin-Bindung ist somit um einiges größer als die Stabilität einer C-terminalen Prolin-Bindung. Dieses Fragmentierungsverhalten wird auch nicht durch Acetylierung beeinflusst (Spektren nicht gezeigt).

### 6.6.2 Einfluss basischer Aminosäuren auf die Sequenzierung - „basische Löcher“ in der Aminosäuresequenz durch Histidin und Arginin

In der B-Kette kann unter verschiedensten Bedingungen ein „Loch“ in der b-Fragment-Ionenserie beobachtet werden. In der Darstellung der Fragment-Ionen-Intensitäten der TPP-Derivate der B-Kette des Rinder-Insulins (siehe Abbildung 124) lässt sich dieser Effekt besonders gut darstellen. Um die Position 22 nehmen die Intensitäten der b-Fragmente ab. Es entsteht ein Lücke in der Sequenzinformation.

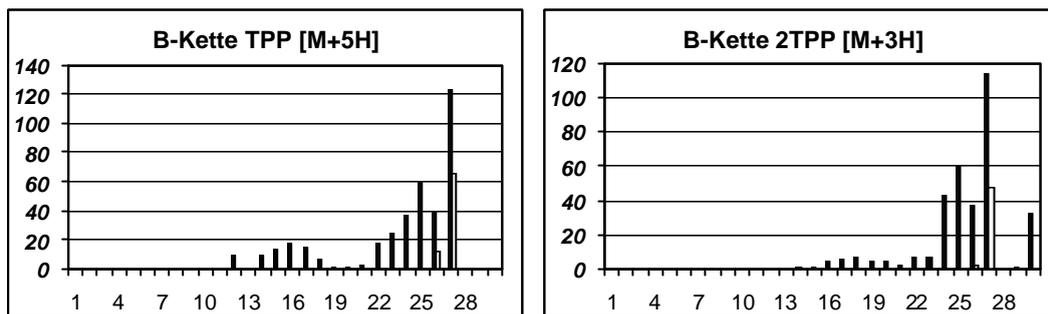


Abbildung 124: Beispiel für das Fehlen von Fragmenten neben Histidin (Position 10) und Arginin (Position 22). Es sind die Fragment-Ionen-Intensitäten des Mono und des Bis-Derivats der B-Kette des Rinder-Insulins dargestellt (Tri-Phenylphosphin = TPP).

Die Ursache hierfür ist die bevorzugte Ladungslokalisierung in der Arginin-Seitenkette, die durch die positive Ladung eine Fragmentierung der Peptidkette in unmittelbarer Umgebung des Arginins verhindert. Das mobile Proton wird durch Coulombabstoßung verdrängt. Für Histidin an Position 10 ist der gleiche Effekt zu beobachten, weshalb auch dort von einer bevorzugten Ladungslokalisierung bei hohen Ladungszuständen ausgegangen werden muss. Dieser Befund wird in der Literatur<sup>137</sup> durch Experimente mit synthetischen Peptiden gestützt. Für eine Reihe von Peptiden wird die Position des Histidins auf der Peptidkette permutiert (verschoben). Wenn das Histidin in der Nähe des N-Terminus lokalisiert ist, wird die Intensität der zweifach geladenen  $\gamma$ -Fragment-Ionen<sup>XXI</sup> drastisch herabgesetzt. Das mobile Proton wird vom N-Terminus verdrängt, da Histidin als Ladungsträger auftritt. Gleichzeitig kann gezeigt werden<sup>137</sup>, dass durch selektive Derivatisierung des Histidins mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) dieser Effekt wieder aufgehoben wird. Durch die Derivatisierung wird zusätzlich der Ladungszustand der Peptide auf +2 erniedrigt, so dass Histidin als potentieller Ladungsträger nachgewiesen werden konnte.

Ein weiterer Beweis dafür, dass Histidin als Ladungsträger auftritt, kann bei Glucagon gefunden werden. Das  $b_5$ -Fragment des Glucagons tritt nach zweifacher Acetylierung (N-Terminus und

<sup>XXI</sup> Für die Bildung von zweifach geladenen  $\gamma^{2+}$ -Fragment-Ionen wird nach dem *charge-site-induced* Mechanismus ein mobiles Proton benötigt.

Lysin) nach wie vor als zweifach geladenes Fragment auf, so dass davon ausgegangen werden kann, dass eine Ladung auf dem Histidin und die andere auf dem Peptidrückgrat lokalisiert, bzw. verteilt sein muss.

Weitere Befunde für eine Ladungslokalisierung am Histidin ergeben sich aus der Acetylierung des Glucagons. Im vierfachen Ladungszustand ergab sich ein intensives  $y_{28}^{3+}$ , das durch Abspaltung des N-terminalen acetylierten Histidin unter Ladungstrennung entstanden ist. Das korrespondierende  $y_1^+$ -Fragment ( $m/z$  180) kann im „in-source-CID“-Experiment nachgewiesen werden. Für das underivatisierte Glucagon lässt sich das protonierte Histidin im „in-source-CID“-Experiment dagegen nicht nachweisen. Im ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des underivatisierten Glucagons  $[M+4H]^{4+}$  ist das  $y_{28}^{3+}$ -Fragment nicht detektierbar. Im Ladungszustand +3 konnte ein  $y_{28}^{3+}$ -Fragment zusammen mit anderen  $y^{3+}$ -Fragment-Ionen beobachtet werden. Durch Acetylierung wird das Fragmentierungsverhalten des dreifachen Ladungszustandes nicht verändert, da durch die drei Ladungen zunächst die anderen basischen Zentren der B-Kette des Glucagons protoniert werden. Erst im Ladungszustand +4 kommt es zu einer Protonierung des N-Terminus.

Das ausschließliche Auftreten des  $y_{28}^{3+}$ -Fragmentes aus dem Ladungszustand 4+ lässt sich darüber erklären, dass bedingt durch die vierte Ladung im underivatisierten Zustand eine Protonierung am N-Terminus stattgefunden haben muss, die keine Fragmentierung zulässt. Durch die Acetylierung wird diese vierte Ladung vom N-Terminus so verschoben, dass  $y_{28}^{3+}$  entsteht. Entweder es hat eine Protonierung des Histidins zur Folge oder das Peptidrückgrat wird mit großer Wahrscheinlichkeit protoniert, so dass es zu einem nahezu ausschließlichen Bindungsbruch C-terminal zu Histidin kommt.

### 6.6.3 Einfluss saurer Aminosäuren

Aspartat als saure Aminosäure ist schon im Zusammenhang mit Prolin<sup>79</sup> als instabile Peptid-Bindung beobachtet worden. Bei Messungen von  $[M-H]^-$  Ionen, die Asp oder Asn enthielten<sup>138</sup>, wurde eine Fragmentierung des Peptidrückgrates über die Enolat-Anionen der Aminosäuren beobachtet. Für Glutamat wurden keine entsprechenden Fragmentierungen beobachtet.

Die hier beobachteten Fragmentierungen erbringen weitere Befunde für den postulierten Mechanismus, der zum bevorzugten Bindungsbruch C-terminal zum Aspartat führt.

Aspartat als N-terminale Aminosäure im Angiotensin I ist für die Fragmentierung der Peptidbindung verantwortlich. Durch Derivatisierungsexperimente mit Sulfonsäurederivaten konnte der als Hauptfragmentierung auftretende Asp-Bindungsbruch vermindert werden. Für den Mechanismus dieser Reaktion ist die Bildung eines Enolat-Anions aus der Carboxylatgruppe nötig, um den Bindungsbruch zu ermöglichen (siehe Abbildung 125).

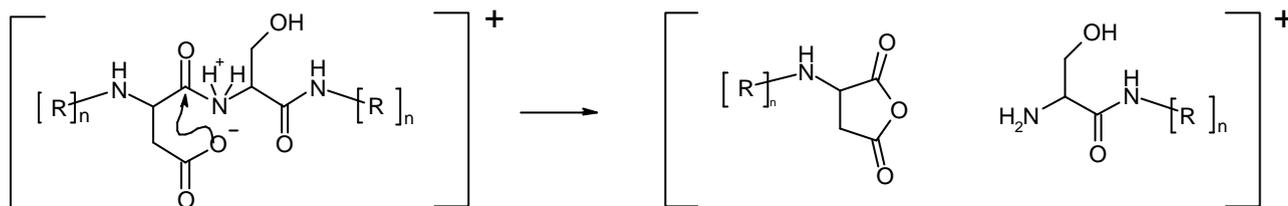


Abbildung 125 : Fragmentierungsmechanismus der spezifischen Fragmentierung C-terminal zu Aspartat.

Dies zeigt der Befund, dass aus  $[M+H]^+$  der Neutralverlust des Asp auftritt. Eine Lokalisierung der Ladung auf dem b<sub>1</sub>-Fragment lässt sich nicht beweisen, da im „in-source“-CID Spektrum das b<sub>1</sub><sup>+</sup>-Fragment nicht detektiert wird. Statt dessen tritt als Basispeak ein  $[b_2-NH_3]^+$  Fragment auf<sup>XXII</sup> (nicht gezeigt). Dies zeigt, dass nach wie vor ein Proton auf dem Arginin und nicht auf dem N-Terminus lokalisiert sein muss.

Protonierungen haben nur insofern einen Einfluss auf die bevorzugte Fragmentierung durch Aspartat, als dass durch hohe Protonierungsgrade des Peptids andere Fragmentierungen in den Vordergrund treten können (siehe 6.5). Im Fragment-Ionenspektrum des Glucagons<sup>XXIII</sup> beispielsweise wird das Fragmentierungsverhalten durch Aspartat bestimmt. Erst bei den Ladungszuständen +3 und +4 werden vermehrt auch andere Fragmentierungen beobachtet.

Das Beispiel Angiotensin I zeigt dafür, dass der Einfluss des Aspartats größer als der des Prolins ist. Im einfachen Ladungszustand ist die Abspaltung des N-terminalen Aspartats der Basispeak. Da diese Fragmentierungsreaktion unabhängig von der direkten Beteiligung eines Protons ist, wirkt sich die Ladungslokalisierung am Arg nicht negativ auf die Intensität dieses Fragment-Ions aus. Erst mit zunehmender Protonierung (Ladungszustand +2 und +3) sind auch hier die Fragmente aus dem Prolinbindungsbruch (b<sub>6</sub> und y<sub>4</sub>) intensiver. Es wird also mindestens ein weiteres Proton benötigt, um den Prolinbindungsbruch zu induzieren. Das zweite Proton verbleibt auf dem y<sub>4</sub><sup>+</sup>-Fragment.

Untersuchungen an Angiotensin II  $[M+2H]^{2+}$  haben gezeigt<sup>139</sup>, dass unterschiedliche Vorläufer-Ionen Strukturen vorhanden sind. Der häufigste Fall ist die Protonierung der Arginin-Seitenkette und die Lokalisierung des zweiten Protons auf dem Peptidrückgrat. Als Grund wird die verminderte Coulombabstoßung angenommen. Daneben existieren noch Vorläufer-Ionen bei denen das zweite Proton auf dem Histidin lokalisiert ist. Durch die hauptsächlich auf dem Peptidrückgrat verteilte Ladung kommt es zur intensiven Fragmentierung am Prolin.

Für die A-Kette von Insulin konnte ein Einfluss von Glutamat auf das Spektrum beobachtet werden. Durch die Acetylierung der A-Kette entstand ein intensives y<sub>18</sub><sup>2+</sup>-Fragment. Ähnlich dem Aspartat könnte auch hier ein Bindungsbruch über ein Enolat-Anion stattgefunden haben. Für das Fehlen

<sup>XXII</sup> Der Verlust von Ammoniak ist spezifisch für protoniertes Arginin.

<sup>XXIII</sup> Glucagon enthält kein Prolin.

dieser Fragmentierung im underivatisierten Zustand kann eine Salzbrücke der Carboxylatgruppe mit dem N-Terminus vermutet werden, die nach der Acetylierung nicht mehr ausgebildet werden kann. Bei anderen Peptiden (B-Kette des Rinder-Insulins, ROS), die ebenfalls Glutamat enthalten, konnte eine derartige spezifische Fragmentierung nicht festgestellt werden.

## **6.7 Theorie des Fragmentierungsverhalten mehrfach geladener Peptide**

Aus den untersuchten Spektren lassen sich Thesen für das Fragmentierungsverhalten mehrfach geladener Vorläufer-Ionen ableiten:

- Es gibt zwei Sorten von Ladungen: (a) mobile Protonen und (b) Ankerprotonen an den basischen Zentren. Je nach Ladungszustand werden die basischen Zentren eines Proteins protoniert.
- Ankerprotonen bewirken nur eine zusätzliche Ladung auf dem Peptid und somit eine niedrigere Ionisierungsenergie für höhere Ladungszustände.
- Mobile Protonen zeigen intensive Fragmentierungen.
- Im maximalen Ladungszustand sind alle basischen Zentren protoniert; nur noch ein Teil der Ladung ist als mobiles Proton vorhanden. Es entstehen nahezu ausschließlich b-Fragmente unterschiedlichen Ladungszustandes und einige kleine y-Fragmente, die den C-Terminus charakterisieren. So kann mit hoher Sicherheit und Wahrscheinlichkeit der C-Terminus bestimmt werden.
- Beeinflussung des Fragmentierungsverhaltens mit Derivaten: Verminderung der Basizität, so dass in Abstimmung mit Coulombwechselwirkungen möglichst viele Ladungen (eine mehr als im underivatisierten) auf dem Peptidrückgrat verteilt sind; dort können sie über einen *charge-site-induced* Mechanismus für intensive Fragment-Ionenbildung sorgen.
- Durch die Einführung von Derivaten mit einer zusätzlichen, aber fixierten Ladung wird die Fragmentierung in der Nähe der Derivate nicht verbessert. Stattdessen wird das mobile Proton in die Mitte des Peptids „geschoben“, um dort Fragmentierungen zu ermöglichen.
- Negative Ladungen am N-Terminus heben die Ladungslokalisierung auf. Durch Sulfonylierung wird der N-Terminus für das mobile Proton zugänglich gemacht. Ein besonders großer Effekt lässt sich beobachten, wenn ein weiteres basisches Zentrum in der Nähe des N-Terminus ist (bei Glucagon: His in Position 1).
- Die negativen Ladungen der Seitenketten (Phosphat, Aspartat im Glucagon, Asp im Angiotensin I) führen in niedrigen Ladungszuständen zu intensiven spezifischen Fragmentierungen, da wenig mobile Protonen vorhanden sind. Der Bindungs-

bruchmechanismus durch Aspartat ist von einem mobilen Proton unabhängig und findet deshalb als einziger Prozess statt.

- Der Prolineffekt bewirkt in fast allen Peptiden (B-Kette, Angiotensin I, ROS-Peptid) einen spezifischen Bindungsbruch N-terminal zu Prolin, sobald genügend Protonen auf dem Peptid vorhanden sind.
- Die meiste Strukturinformation ergibt sich aus dem Ion, welches gerade ein mobiles Proton trägt; unter optimalen Ionisationsbedingungen sollte dies auch der bevorzugte Ladungszustand sein.

Grafisch lässt sich das Fragmentierungsverhalten über die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des mobilen Protons darstellen (siehe Abbildung 126). Es entstehen überall dort intensive Fragmentierungen, wo die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Protons erhöht ist. Durch Derivatisierungen lässt sich das mobile Proton auf der Peptidkette „verschieben“. Das Ausmaß der Aufenthaltswahrscheinlichkeit lässt sich mit den hier benutzten Methoden nicht quantifizieren; lediglich eine qualitative Aussage ist möglich.

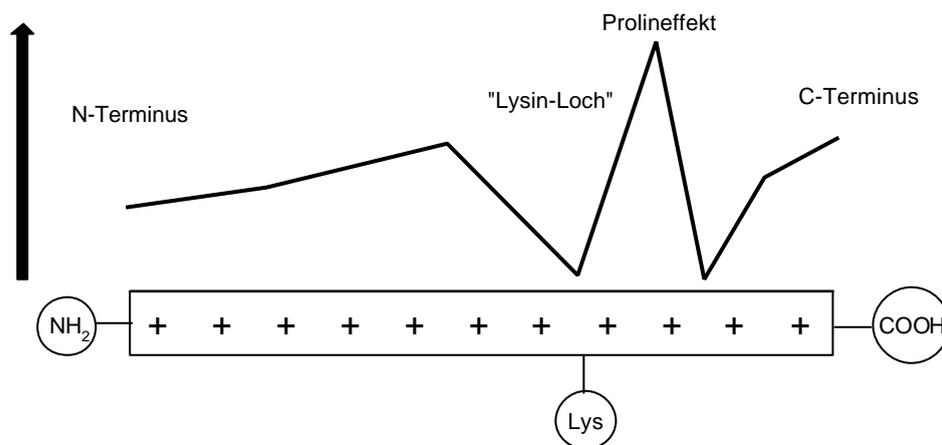


Abbildung 126: Modell für die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des mobilen Protons. Lys steht stellvertretend für basische Aminosäuren (His, Arg).

Für niedrige Ladungszustände ist noch die spezifische Fragmentierung durch Aspartat in das Modell aufzunehmen. Allerdings ist für diese Fragmentierung nicht die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des mobilen Protons ausschlaggebend, sondern die Übertragung des aciden Protons aus der Seitenkette des Aspartats.

## 6.8 Rückschlüsse für die „de novo“ Sequenzierung von mehrfach geladenen Peptiden

Für die „de novo“ Sequenzierung von Proteinen und Peptiden können die Einflüsse der untersuchten Derivatisierungen zu einem Arbeitsschema zusammengefasst werden. Je nach Fragestellung ist die Vorgehensweise sehr individuell, da das Fragmentierungsverhalten der Peptide auch zu einem großen Teil von der Sequenz selbst bzw. den spezifischen Bindungsbrüchen einzelner Aminosäuren, beeinflusst wird. Dennoch konnte für die Derivatisierungen eine gezielte Manipulation des Fragmentierungsverhaltens beobachtet werden. Diese Erkenntnisse können für die Sequenzierung unbekannter Peptide und Proteine genutzt werden.

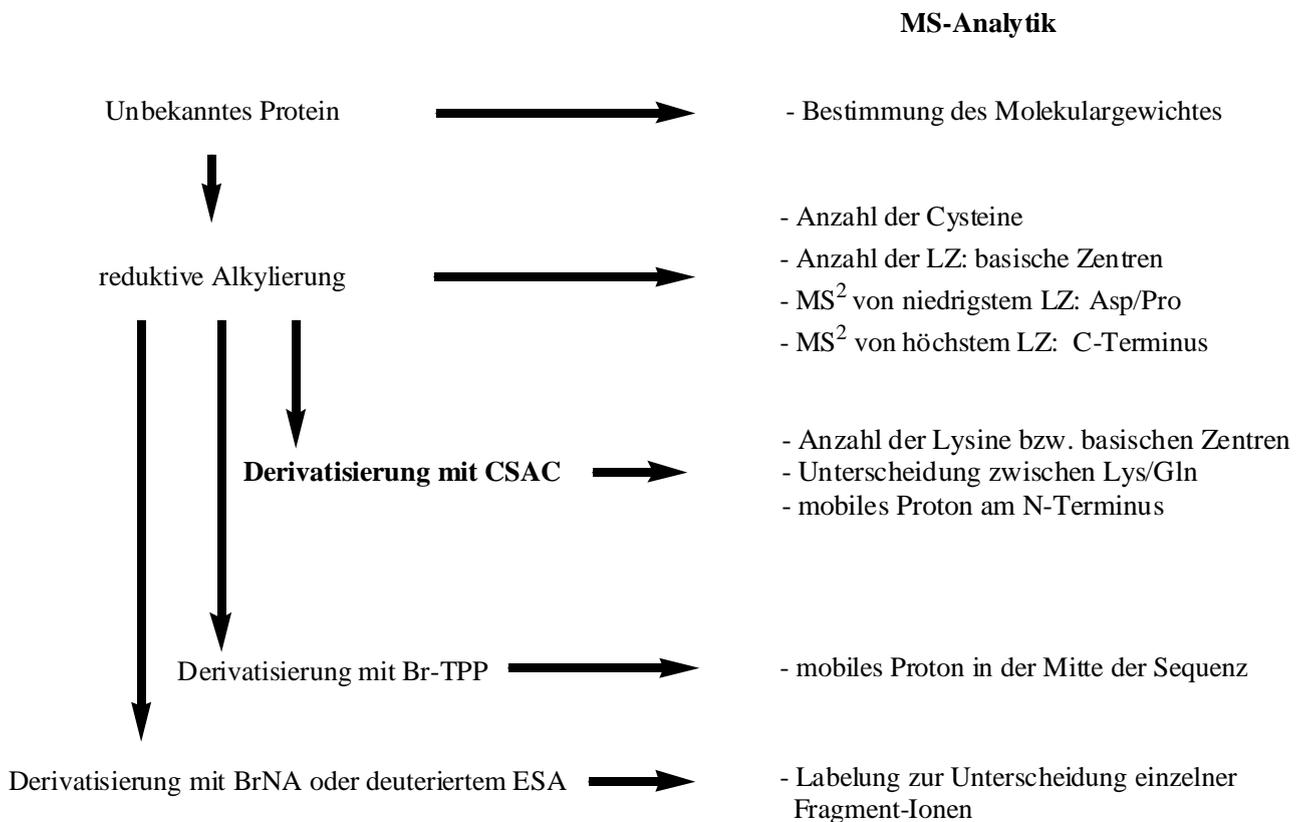


Abbildung 127: Derivatisierungsschema für die "de novo" Sequenzierung; Ladungszustand (LZ), Chloro-Acetyl-Sulfonylchlorid (CSAC), (Bromo-ethyl)-triphenylphosphin (Br-TPP), Brom-Nikotinsäure (BrNA), Essigsäureanhydrid (ESA). Die Derivatisierung mit deuteriertem ESA ist eine Derivatisierung, bei der zu 50% deuteriertes ESA eingesetzt wird.

Von sämtlichen Derivaten ist es sinnvoll, möglichst viele Ladungszustände im MS<sup>2</sup>-Experiment zu untersuchen, damit ein Maximum an Sequenzinformationen erhalten werden kann. Dabei scheint zunächst die Interpretation der Spektren von hohen Ladungszuständen sehr komplex zu sein. Dadurch dass ausschließlich Fragmentierungen im C-terminalen Bereich entstehen, lässt sich der C-Terminus gezielt identifizieren. Da die entsprechenden Fragment-Ionen in mehreren Ladungszuständen vorkommen, kann die Sequenz mehrfach belegt werden.

Von den Derivatisierungsreaktionen ist die Acylierung mit CSAC die effektivste, da durch die Einführung einer negativen Ladung das mobile Proton auf den N-Terminus verschoben wird. Eine Identifizierung des N-Terminus ist durch die Abspaltung von CSAC ( $\Delta m = 122$ ) unproblematisch, da automatisch das höchste  $\gamma$ -Fragment bestimmt werden kann. Allerdings sollte hier nicht der maximale Ladungszustand des Peptids untersucht werden, da dann der Einfluss des Protonierungsgrades überwiegt und es zu einer Fragmentierung des C-Terminus kommt.

Je nach Fragestellung ist eine Derivatisierung mit Br-TPP empfehlenswert, wenn z. B. die Sequenz in der Mitte des Peptids aufgeklärt werden soll. Als Nebeneffekt muss allerdings mit einer Abspaltung (Fragmentierung) des Derivats gerechnet werden.

## **6.9 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Es wurden Modellpeptide (bis zu einer Größe von 30 Aminosäuren) in Lösung chemisch modifiziert, mit dem Ziel das Fragmentierungsverhalten der Peptidderivate unter Niederenergie Stoßaktivierungsbedingungen zu verbessern. Durch die Derivatisierungen wurde die Basizität des N-Terminus und der  $\epsilon$ -Amino-Gruppe des Lysins vermindert, so dass eine Gleichverteilung der Protonen über das gesamte Peptidrückgrat erreicht werden konnte.

Anhand dieser Modellpeptide konnten die Einflüsse von unterschiedlichen Derivatisierungen und des Ladungszustandes der Vorläufer-Ionen systematisch untersucht werden. Dabei ließen sich die Fragmentierungen auf dem Peptidrückgrat so steuern, dass bevorzugt Bindungsbrüche am N-Terminus (durch Derivatisierung mit CSAC), in der Mitte des Peptids (durch Derivatisierung mit Br-TPP) oder am C-Terminus (durch Fragmentierung des maximalen Ladungszustandes) stattfanden. Daraus ergibt sich für die Strukturaufklärung von Proteinen die Möglichkeit, je nach Fragestellung gezielt die Fragmentierung der interessierenden Aminosäuresequenz eines Peptids zu fördern.

Des Weiteren wurden die sequenzspezifischen Fragmentierungen einzelner Aminosäuren untersucht (Aspartat, Prolin, Serin und Histidin). Es konnten durch die Derivatisierungen Beweise für den Fragmentierungsmechanismus von Aspartat gefunden werden.

## 6.10 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die beschriebenen Derivatisierungsreaktionen zur Steuerung des Fragmentierungsverhaltens von Peptiden geeignet sind. Lediglich die Instabilität des Br-TPP-Derivates, welches eine fixierte positive Ladung im Peptid einführt, ist noch verbesserungswürdig. Hier könnten weitere Derivatisierungsreagenzien, die ebenfalls eine zusätzliche fixierte Ladung auf das Peptid bringen, auf ihre Anwendbarkeit untersucht werden.

Alle hier durchgeführten Derivatisierungen wurden an „reinen“ Peptiden durchgeführt. Die Untersuchung der einzelnen Derivatisierungsreaktionen an den Modell-Peptiden erfolgte vor dem Hintergrund, dass Fragmentierungsverhalten von unbekanntem Proteinen oder Peptidfragmenten eines (tryptischen) Proteinverdau zu verbessern bzw. dadurch die Interpretierbarkeit der erhaltenen Fragment-Ionenspektren zu vereinfachen. Diese Peptidfragmente liegen als sehr heterogenes Substanzgemisch vor und müssen vor der massenspektrometrischen Analyse über eine Chromatographie getrennt werden. Um bei dieser Methode effizient arbeiten zu können, wäre eine Derivatisierung der Proteine erstrebenswert, während sie an das Säulenmaterial gebunden sind (*on-column* Derivatisierung)<sup>140</sup>. Eine Variante bei Unverträglichkeit des Säulenmaterials gegenüber dem Derivatisierungsreagenz ist die Derivatisierung direkt nach der Elution der Proteine (*post-column* Derivatisierung). Bei Isolierung des Proteins über eine 2D-Gelelektrophorese könnte ein modifiziertes Protokoll zur „*in gel*“ Derivatisierung erarbeitet werden.

Peptidfragmente eines tryptischen Verdau besitzen am C-Terminus immer eine basische Aminosäure<sup>XXIV</sup>. Dadurch fragmentieren die zweifach geladenen Vorläufer-Ionen in der Regel sehr gleichmäßig (Ausbildung sowohl von intensiven  $\gamma$ - als auch von  $\beta$ -Fragmenten). Bei nicht erfolgtem Verdau einzelner Lysine oder Arginine (*missed-cleavage*) könnten diese durch die Derivatisierungen identifiziert und der Einfluss der zusätzlichen basischen Aminosäure aufgehoben werden.

Die Strukturaufklärung von intakten Proteinen könnte mit Hilfe der die Fragmentierung dirigierenden Derivatisierungen und einer magnetischen Ionenfalle (FT-ICR) mit verbessertem Auflösungsvermögen ( $r = 1 \text{ Million}^{141}$ ) realisiert werden. Mit der Größe der Proteine nimmt zwangsläufig auch die Anzahl der Parameter zu, die das Fragmentierungsverhalten beeinflussen. Selbst wenn die Einflüsse für die in der Arbeit beschriebenen Modellpeptide im Einzelnen verstanden sind, so könnten sich bei größeren intakten Proteinen neue Effekte ergeben. Ob sich so die Idee einer Proteinsequenzierung ohne Trypsin verwirklichen lässt, wird die Zukunft der biochemischen Massenspektrometrie zeigen.

## 7 Anhang

### 7.1 Übersicht über die verwendeten Peptide/Proteine

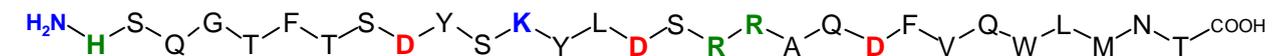
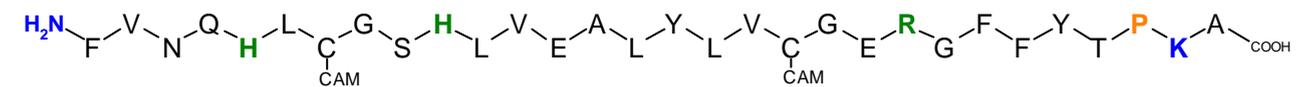
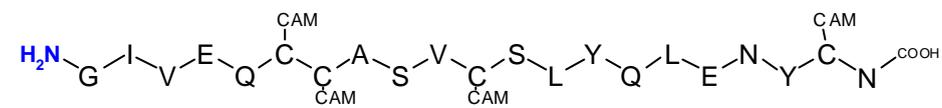
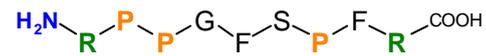
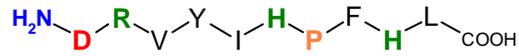


Abbildung 128: Die verwendeten Proteine von oben nach unten; Angiotensin I, Bradykinin, A-Kette des Rinder-Insulins, B-Kette des Rinder-Insulins, Glucagon.

## 7.2 Literaturverzeichnis

---

- <sup>1</sup> I. W. Griffiths; J. J. Thompson – the Centenary of his Discovery of the Electron and of his Invention of Mass Spectrometry; *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **11**, 2-16 (1997).
- <sup>2</sup> J. J. Thompson; On Rays of Positive Electricity, *The London, Edinburgh and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, XLVII (1907).  
J. J. Thompson; Rays of Positive Electricity and their Application to Chemical Analysis, London: Longmans, Green and Co. Ltd.; (1913).
- <sup>3</sup> F. W. Aston; Mass Spectra and Isotopes, Eckward Arnold and Co., London 1942.
- <sup>4</sup> A. G. Harrison, R. J. Cotter; Methods of Ionization, *Methods Enzymol.*, **193**, 3-37 (1990).
- <sup>5</sup> M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler; Fast atom bombardment of solids as an ion source in mass spectroscopy, *Nature*, **293**, 270-275 (1981).
- <sup>6</sup> M. Karas, F. Hillenkamp; Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10000 Daltons, *Analytical Chemistry*, **60**, 2299-2301 (1988).
- <sup>7</sup> B. Spengler, D. Kirsch, R. Kaufmann; Metastable decay of peptides and proteins in matrix-assisted laser desorption mass spectrometry; *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **5**, 198-202 (1991).
- <sup>8</sup> B. Spengler, D. Kirsch, R. Kaufmann; Peptide sequencing by matrix-assisted laser desorption mass spectrometry; *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **6**, 105-108 (1992).
- <sup>9</sup> F. Sanger, *Biochemical Journal*, **39**, 507-515 (1945).  
F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 5463-5467(1977).
- <sup>10</sup> H. P. Happersberger, M. Przybylski, M. O. Glocker; Selective Bridging of Bis-Cysteinylyl Residues by Arsenous Acid Derivatives as an Approach to the Characterization of Protein Tertiary Structures and Folding Pathways by Mass Spectrometry; *Analytical Biochemistry*, **264**, 237-250 (1998).
- <sup>11</sup> D. Suckau, M. Mak, M. Przybylski; Protein surface topology-probing by selective chemical modification and mass spectrometric peptide mapping, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5630-5634 (1992).
- <sup>12</sup> A. Pandey, M. Mann; Proteomics to study genes and genomes, *Nature*, **405**, 837-846 (2000).
- <sup>13</sup> W. J. Henzel, T. M. Billeci, J. T. Stults, S. C. Wong, C. Grimley, C. Watanabe; Identifying Proteins from 2-Dimensional Gels by Molecular Mass Searching of Peptide Fragments in Protein Sequence Databases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5011-5015 (1993).
- <sup>14</sup> D. J. C. Pappin P. Hoirup, A. J. Bleasby; Rapid Identification of Proteins by Peptide-Mass Fingerprinting, *Current Biology*, **3**, 327-332 (1993).
- <sup>15</sup> S. Hopper, R. S. Johnson, J. E. Vath, K. Biemann; Glutaredoxin from Rabbit Bone Marrow, *The Journal of Biological Chemistry*, **264**, No.34, 20438-20447 (1989).
- <sup>16</sup> M. Mann, P. Hojrup, P. Roepstorff; Use of Mass Spectrometric Molecular Weight Information to identify Proteins in Sequence Databases, *Biological Mass Spectrometry*, **22**, 338-345 (1993).
- <sup>17</sup> B. W. Gibson, K. Biemann; Strategy for the mass spectrometric verification and correction of the primary structures of proteins deduced from their DNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1956-1960 (1984).
- <sup>18</sup> Ph.-H. Hirel, J.-M. Schmitter, P. Dessen, G. Fayat, S. Blanquet; Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 8247-8251 (1989).

- 
- <sup>19</sup> M. W. Southworth, J. Benner F. B. Perler; An alternative protein splicing mechanism for inteins lacking an N-terminal nucleophile, *The EMBO Journal*, **19**, 5019-5026 (2000).
- <sup>20</sup> K. L. Bush; Desorption Ionization Mass Spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, **30**, 233-240 (1995).
- <sup>21</sup> M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler; Fast atom bombardment of solids: a new ion source for mass spectrometry; *Journal of the Chemical Society: Chemical Communications*; **7**, 325-327 (1981).
- <sup>22</sup> J. R. Day, S. E. Unger, R. G. Cooks; Molecular secondary ion mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, **52**, 557A-572A (1980).
- <sup>23</sup> A. L. Burlingame, T. A. Baillie, P. J. Derrick; Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, **58**, 165R-211R (1986).
- <sup>24</sup> J. Sunner; Ionization in liquid secondary ion mass spectrometry, *Organic Mass Spectrometry*, **28**, 805-823 (1993).
- <sup>25</sup> A. Overberg, M. Karas, U. Bahr, R. Kaufmann, F. Hillenkamp; Matrix-assisted infrared-laser (2.94  $\mu\text{m}$ ) desorption/ionization; *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **4**, 293-296; 1990.
- <sup>26</sup> R. Zenobi, R. Knochenmuss, Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.*, **17**, 337-366 (1998).
- <sup>27</sup> F. Hillenkamp, M. Karas, R.C. Beavis, B.T. Chait; Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization; Mass Spectrometry of Biopolymers, *Anal. Chem.* **63**, 1193A-1202A (1991).
- <sup>28</sup> Autoren im Schwerpunktheft: Focus on Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **9** (1998).
- <sup>29</sup> R. Knochenmuss, A. Stortelder, K. Breuker, R. Zenobi; Secondary ion-molecule reactions in matrix-assisted laser desorption/ionisation, *Journal of Mass Spectrometry*, **35**, 1237-1245 (2000).
- <sup>30</sup> R. Johnson, B. Sundquist; *Rapid Communications in Mass Spectrometry* , **5**, 574, (1991).
- <sup>31</sup> A. Vertes, R. D. Levine; Sublimation versus fragmentation in matrix-assisted laser desorption ; *Chemical Physics Letters*, **171**, 284-290 (1990).
- <sup>32</sup> M. Karas, M. Glückmann, J. Schäfer; Ionization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors, *Journal of Mass Spectrometry*, **35** (1), 1-12, (2000).
- <sup>33</sup> M. Dole, L. L. Mach, R. L. Hunes, R. C. Mobley, L.P. Ferguson, M. B. Alice; *Journal of Chem. Phys.*, **49**, 2240 (1968).
- <sup>34</sup> F. Lottspeich, H. Zorbas (Herausgeber); Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 349 (1998).
- <sup>35</sup> J. V. Iribarne, B. A. Thomson; On the evaporation of small ions from charged droplets; *Journal of Chem. Phys.*, **64**, 2287-2294 (1976).
- <sup>36</sup> B. A. Thomson, J. V. Iribarne; Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure, *Journal of Chem. Phys.*, **71**, 4451-4463 (1979).
- <sup>37</sup> J. B. Fenn; Ion formation from charged droplets: roles of geometry, energy, and time, *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, **4**, 524-535 (1993).
- <sup>38</sup> P. Kerbarle, L. Tang; From ions in solution to ions in the gas phase, *Analytical Chemistry*, **65**, 972A-986A (1993).
- <sup>39</sup> L. Martens; Isolierung des KGF/KGFR-Komplexes nach Expression und Reinigung seiner Komponenten und deren massenspektrometrischer Charakterisierung, Diplomarbeit, Institut für Biochemie, Köln (2000).
- <sup>40</sup> L. Konermann, D. J. Douglas; Unfolding of Proteins Monitored by Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A comparison of positive and negative Ion Modes; *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, **9**, 1248-1254; (1998).

- 
- <sup>41</sup> R. B. Kodali, Y.L. Chen, B. A. Collings, D. J. Douglas; Methanol-Induced Conformational Transitions of Cytochrome C and Lysozyme at Low pH: A Study by ESI-MS, *Proceedings of the 47<sup>th</sup> Conference of the American Society of Mass Spectrometry* (1999).
- <sup>42</sup> R. J. Cotter; Time-of-flight mass spectrometry: an increasing role in the life sciences, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **18**, 513-532 (1989).
- <sup>43</sup> F. Lottspeich, H. Zorbas (Herausgeber); Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 328 (1998).
- <sup>44</sup> M. L. Vestal, P. Juhasz, S. A. Martin; Delayed Extraction Matrix-assisted Laser Desorption Time-of flight Mass Spectrometry; *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **9**, 1044-1050 (1995).
- <sup>45</sup> F. Lottspeich, H. Zorbas (Herausgeber); Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 342 (1998).
- <sup>46</sup> R. S. Brown, J. J. Lennon; Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer, *Anal. Chem.*, **67**, 1998 – 2003 (1995).
- <sup>47</sup> W. Paul, H. Steinwedel; A new mass spectrometer without a magnetic field; *Zeitung für Naturforschung*, **8a**, 448-450 (1953).
- <sup>48</sup> F. Lottspeich, H. Zorbas (Herausgeber); Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 357 (1998).
- <sup>49</sup> W. Paul und H. S. Steinwedel; *US Patent*, 2939952 (1960).
- <sup>50</sup> G. C. Stafford, P. E. Kelley, J. E. Syka, W. E. Reynolds, J. F. J.; *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **60**, 85 (1984).
- <sup>51</sup> a) Finnigan, LCQ MS-Detector Hardware Manual; b) [www.rzuser.uni-heidelberg.de/~bl5/index.html](http://www.rzuser.uni-heidelberg.de/~bl5/index.html).
- <sup>52</sup> C. L. Wilkins; Fourier Transform Mass Spectrometry; *Analytical Chemistry*, **50**, 493A- 497A (1990).
- <sup>53</sup> S. C. Beu, M. W. Senko, J. P. Quinn, F. W. McLafferty; Improved Fourier-Transform ion cyclotron-resonance mass spectrometry of large biomolecules, *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, **4**, 190-193 (1993).
- <sup>54</sup> K. A. Sannes-Lowery, J. J. Drader, R. H. Griffey, S. A. Hofstadler; Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry as a high throughput affinity screen to identify RNA binding ligands; *Trends in Analytical chemistry*, **19**, no. 8 (2000).
- <sup>55</sup> D. P. Little, J. P. Speir, M. W. Senko, P. B. O'Connor, F. W. McLafferty; Infrared Multiphoton Dissociation of Large Multiply Charged Ions for Biomolecule Sequencing, *Analytical Chemistry*, **66**, 2809-2815 (1994).
- <sup>56</sup> T. Dienes, S. J. Pastor, S. Schürch, J. R. Scott, J. Yao, S. Cui, C. L. Wilkins; Fourier Transform Mass Spectrometry-Advancing Years (1992-Mid. 1996); *Mass Spectrometry Reviews*, **15**, 163-211 (1996).
- <sup>57</sup> J. R. Yates; Mass Spectrometry and the age of the proteome, *J. Mass Spectrom.*, **33**, 1 – 19 (1998).
- <sup>58</sup> J. N. Louris, J. S. Brodbelt-Lustig, R. G. Cooks, G. L. Glish, G. J. Van Berkel, S. A. McLuckey; Ion isolation and sequential stages of mass spectrometry in a quadrupole ion trap mass spectrometer, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **96**, 117-137 (1990).
- <sup>59</sup> E. De Hoffmann, J. Charette, V. Stroobant; *Mass Spectrometry, Principles and Applications*, John Wiley & Sons, Chichester, S. 58 (1994).
- <sup>60</sup> W. D. Lehmann; *Massenspektrometrie in der Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 147-149 (1996).
- <sup>61</sup> B. Spengler, D. Kirsch, R. Kaufmann; Fundamental aspects of postsource decay in matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. 1. Residual gas effects; *Journal of Physical Chemistry*; **96**, 9678-9684 (1992).
- <sup>62</sup> F. Lottspeich, H. Zorbas (Herausgeber); Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 343 (1998).

- <sup>63</sup> X. Tang, W. Ens, K. G. Standing, J. B. Westmore; Daughter ion mass spectra from cationized molecules of small oligopeptides in a reflecting time-of-flight mass spectrometer, *Analytical Chemistry*, **60**, 1791-1799 (1988).
- <sup>64</sup> C. D. Hanson, C. L. Just; Selective background suppression in MALDI-TOF mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, **66**, 3676-3680 (1994).
- <sup>65</sup> I. A. Papayanopoulos; The Interpretation of Collision-induced Dissociation tandem mass spectra of peptides, *Mass Spectrometry Reviews*, **14**, 49-73 (1995).
- <sup>66</sup> K. Biemann; *Methods in Enzymology* (McCloskey, J. A., Ed.) Academic Press, San Diego, **193**, 888 (1990).
- <sup>67</sup> P. Edman, G. Begg; A Protein Sequenator, *European Journal of Biochemistry*, **1**, 80-91 (1966).
- <sup>68</sup> P. Roepstorff, J. Fohlman; Proposal for a common Nomenclature for Sequence Ions in Mass Spectrometry, *Journal of Biomedical Mass Spectrometry*, **11**, 601, (1984).
- <sup>69</sup> D. R. Mueller, M. Eckersley, W. J. Richter; Hydrogen Transfer Reactions in the Formation of  $y^{2+}$  Sequence Ions from Protonated Peptides, *Journal of Organic Mass Spectrometry*, **23**, 217-222, (1988).
- <sup>70</sup> D. F. Hunt, J. R. Yates, J. Shabanowitz, S. Winston, C. R. Hauer; *PNAS USA*, **83**, 6233 (1986).
- <sup>71</sup> P. T. M. Kenny, K. Nomoto, R. Orlando, Fragmentation studies of peptides: the formation of  $y$  ions, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **6**, 95-97 (1992).
- <sup>72</sup> X.-J. Tang, R. K. Boyd, An Investigation of Fragmentation Mechanisms of Doubly Protonated tryptic Peptides, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **6**, 651-657 (1992).
- <sup>73</sup> A. J. Alexander, P. Thibault, R. K. Boyd, J. M. Curtis, K. L. Rinehart; *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **98**, 107-134 (1990).
- <sup>74</sup> P.-C. Liao, Z.-H. Huang, J. Allison; Charge Remote Fragmentation of Peptides Following Attachment of a Fixed Positive Charge : A Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Postsource Decay Study, *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, **8**, 501-509 (1997).
- <sup>75</sup> R. D. Smith, J.A. Loo, C. G. Edmonds, C.J. Barinaga, H. R. Udseth, Perspective: Analytical Biotechnology, New Developments in Biochemical Mass Spectrometry: Electrospray Ionization, *Analytical Chemistry*, **62**, 882-899, (1990).
- <sup>76</sup> V. S. K. Kolli, R. Orlando, Complete Sequence Confirmation of Large Peptides by High Energy Collisional Activation of Multiply Protonated Ions; *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, **6**, 234-241 (1995).
- <sup>77</sup> X.-J. Tang, P. Thibault, R. K. Boyd; Fragmentation Reactions of Multiply-Protonated Peptides and Implications for Sequencing by Tandem Mass Spectrometry with Low-Energy Collision-Induced Dissociation, *Analytical Chemistry*, **65**, 2824-2834 (1993).
- <sup>78</sup> D. Piszkievicz, M. Landon, E. L. Smith; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **40**, 1173-1178 (1970).
- <sup>79</sup> W. Yu, J. E. Vath, M. C. Huberty, S. A. Martin; Identification of the Facile Gas-Phase Cleavage of the Asp-Pro and Asp-Xxx Peptide Bonds in Matrix-Assisted Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, **65**, 3015-3023 (1993).
- b) J. A. Loo, C. G. Edmonds, R. D. Smith, Tandem Mass Spectrometry of Very Large Molecules 2. Dissociation of Multiply Charged Proline-containing Proteins from Electrospray Ionization, *Analytical Chemistry*, **65**, 425-438, (1993).
- <sup>80</sup> H.-D. Jakubke; Peptide, Chemie und Biologie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, S. 95ff und S. 170ff (1996).

- 
- <sup>81</sup> Ph.-H. Hirel, J.-M. Schmitter, P. Dessen, G. Fayat, S. Blanquet; Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid; *Proceedings in the Natural Academic of Science USA*, **86**, 8247-8251, (1989).
- <sup>82</sup> W. D. Lehmann, Massenspektrometrie in der Biochemie; *Spektrum Verlag*, Heidelberg, S. 300 (1996).
- <sup>83</sup> K. Biemann, H. A. Scoble; Characterization by tandem mass spectrometry of structural modifications in proteins, *Science*, **237**, 992-998 (1987).
- <sup>84</sup> T. Cobey, B. Shushan, R. Bonner, W. Schroder, F. Hucho, Methods in Protein Sequence Analysis, Birkhauser Press: Basel, Switzerland, 249-256 (1991).
- <sup>85</sup> B. W. Gibson; Biological Mass Spectrometry, Editors: A. L. Burlingame, J.A. McCloskey; Amsterdam, 315-336 (1990).
- <sup>86</sup> S. Metzger, R. Hoffmann; Studies on the dephosphorylation of phosphotyrosine-containing peptides during post-source decay in matrix-assisted laser desorption/ionisation, *Journal of Mass Spectrometry*, **35**, 1165-1177 (2000).
- <sup>87</sup> W. B. Huttner; Tyrosine Sulfation And The Secretory Pathway, *Annual Reviews in Physiology*, **50**, 363-376 (1988).
- <sup>88</sup> W. B. Huttner; *Methods in Enzymology*, **107**, F. Wold and K. Moldave (Eds), Academic Press, San Diego, S. 200 (1984).
- <sup>89</sup> T. Yagami, K. Kitagawa, S. Futaki; Liquid Secondary-ion Mass Spectrometry of Peptides Containing Multiple Tyrosine-O-sulfates, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **9**, 1335-1341 (1995).
- <sup>90</sup> K. L. Busch, S. E. Unger, A. Vincze, R. G. Cooks, T. Keough; Desorption ionization mass spectrometry: sample preparation for secondary ion mass spectrometry, laser desorption, and field desorption; *Journal of the American Chemical Society*, **104**, 1507-1511 (1982).
- <sup>91</sup> A. M. Falick, D. A. Maltby; Derivatization of hydrophilic peptides for liquid secondary ion mass spectrometry at the picomole level; *Analytical Biochemistry*, **182**, 165-169 (1989).
- <sup>92</sup> K. D. W. Roth, Z.-H. Huang, N. Sadagopan, J. T. Watson; Charge Derivatization of Peptides for Analysis by Mass Spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews*, **17**, 255-274 (1998).
- <sup>93</sup> M. Brinkley; A Brief Survey of Methods for Preparing protein Conjugates with Haptens, and Cross-Linking Reagents, *Bioconjugate Chemistry*, **3**, 2-13 (1992).
- <sup>94</sup> M. O. Glocker, C. Borchers, W. Fiedler, D. Suckau, M. Przybylski; Molecular Characterization of Surface Topology in Protein Tertiary Structures by Amino-Acylation and Mass Spectrometric Peptide Mapping, *Bioconjugate Chemistry*, **5**, 583-590 (1994).
- <sup>95</sup> D. F. Hunt, A. M. Buko, J. M. Ballard, J. Shabanowitz, A. B. Giordani; Sequence Analysis of Polypeptides by Collision Activated Dissociation on a Triple Quadrupole Mass Spectrometer, *Biomedical Mass Spectrometry*, **8**, 397-408 (1981).
- <sup>96</sup> M. Miyagi, M. Nakao, T. Nakazawa, I. Kato, S. Tsunasawa; A Novel Derivatization Method with 5-Bromo-nicotinic Acid N-Hydroxysuccinimide for Determination of the Amino Acid Sequences of Peptides, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **12**, 603-608 (1998).
- <sup>97</sup> S. Dikler, J. W. Kelly, D. H. Russell; Improving Mass Spectrometric Sequencing of Arginine-containing Peptides by Derivatization with Acetylacetone, *Journal of Mass Spectrometry*, **32**, 1337-1349 (1997).
- <sup>98</sup> R. A. J. O'Hair, G. E. Reid; Derivatization of protonated Peptides via Gas Phase Ion-Molecule Reactions with Acetone, *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, **11**, 244-256 (2000).

- 
- <sup>99</sup> Z.-H. Huang, T. Shen, J. Wu, D. A. Gage, J. T. Watson; Protein Sequencing by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Postsource Decay-Mass Spectrometry Analysis of the N-Tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphine-Acetylated Tryptic Digests, *Analytical Biochemistry*, **268**, 305-317 (1999).
- <sup>100</sup> D. S. Wagner, A. Salari, D. A. Gage, J. Leykam, J. Fetter, R. Hollingsworth, J. T. Watson; Derivatization of Peptides to Enhance Ionization Efficiency and Control Fragmentation During Analysis by FAB-MS, *Biological Mass Spectrometry*, **20**, 419-425 (1991).
- <sup>101</sup> O. Burlet, C.-Y. Yang, S. J. Gaskell; Influence of Cysteine to Cysteic Acid Oxidation on the Collision-Activated Decomposition of Protonated Peptides: Evidence for Intraionic Interactions, *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, **3**, 337-344 (1992).
- <sup>102</sup> K. A. Cox, S. J. Gaskell, M. Morris, A. Whiting; Role of the Site of Protonation in the Low-Energy Decompositions of Gas-Phase Peptide Ions, *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, **7**, 522-531 (1996).
- <sup>103</sup> T. Keough, R. S. Youngquist, M.P. Lacey; A New Method for High-Sensitivity Peptide Sequencing Using PSD-MALDI Mass Spectrometry, *Proceedings of the 47<sup>th</sup> Conference of the American Society of Mass Spectrometry* (1999).
- <sup>104</sup> T. Keough, M. P. Lacey, et. al.; Tandem mass spectrometry methods for definitive protein identification in proteomics research, *Electrophoresis*, **21**, 2252-2265 (2000).
- <sup>105</sup> M. D. Bauer, Y. Sun, T. Keough, M. P. Lacey; Sequencing of sulfonic acid derivatized peptides by Electrospray Mass Spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **14**, 924-929 (2000).
- <sup>106</sup> I. Lindh, L. Hjelmqvist, T. Bergman, J. Sjövall, W. J. Griffiths; "De Novo" Sequencing of Proteolytic Peptides by a Combination of C-Terminal Derivatization and Nano-Electrospray/Collision-Induced Dissociation Mass Spectrometry, *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, **11**, 673-686 (2000).
- <sup>107</sup> D. Renner, G. Spiteller; Mechanism of Fragmentation Reactions of  $[MH]^+$  Ions obtained from Peptides by Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry, *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*, **13**, 405-410 (1986).
- <sup>108</sup> M. Schnölzer, P. Jedrzejewski, W. D. Lehmann; Protease-catalyzed incorporation of  $^{18}O$  into peptide fragments and its application for protein sequencing by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Electrophoresis*, **17**, 945-953 (1996).
- <sup>109</sup> E. Abderhalder, W. Stix; *Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie*, **129**, 143-156 (1923).
- <sup>110</sup> X. Chen, V. Anderson, Y. H. Chen; Isotope Edited Product Ion Assignment by a-N Labeling of Peptides with  $[^2H_3(50\%)]2,4$ -Dinitrofluorbenzene, *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, **10**, 448-452 (1999).
- <sup>111</sup> O. Norregarad Jensen et. al.; Protein analysis by mass spectrometry, *Protein Structure A practical approach*, Edited by T. E. Chreighton, Oxford University Press, S. 46 (1997).
- <sup>112</sup> M. O. Glocker, C. Borchers, W. Fiedler, D. Suckau, M. Przybylski; Molecular Characterization of Surface Topology in Protein Tertiary Structures by Amino-Acylation and Mass Spectrometric Peptide Mapping, *Bioconjugate Chemistry*, **5**, 583-590 (1994).
- <sup>113</sup> D. S. Wagner, A. Salari, D. A. Gage, J. Leykam, J. Fetter, R. Hollingsworth, J. T. Watson; Derivatization of Peptides to Enhance Ionization Efficiency and Control Fragmentation During Analysis by FAB-MS, *Biological Mass Spectrometry*, **20**, 419-425 (1991).

- <sup>114</sup> T. Keough, R. S. Youngquist, M. P. Lacey; A method for high-sensitivity peptide sequencing using postsorce decay matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7131-7136 (1999).
- <sup>115</sup> F. Xiang, R. C. Beavis; A method to increase contaminant tolerance in protein-assisted laser desorption/ionization by the fabrication of thin protein-doped polycrystalline films; *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **8**, 199-204 (1994).
- <sup>116</sup> M. Kussmann, E. Nordhoff, H. Rahbek-Nielsen, S. Haebel, M. Rossel-Larsen, L. Jakobsen, J. Gobom, E. Mirgorodskaya, A. Kroll-Kristensen, L. Palm, P. Roepstorff; Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Sample Preparation Techniques Design for Various Peptide and Protein Analytes, *Journal of Mass Spectrometry*, **32**, 593-601 (1997).
- <sup>117</sup> O. Vorm, P. Roepstorff, M. Mann; Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI-TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation, *Analytical Chemistry*, **66**, 3281-3287 (1994).
- <sup>118</sup> M. Moini; Ultramark 1621 as a Calibration/Reference compound for MS II. Positive- and Negative-ion Electrospray ionization; *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **8**, 711-714 (1994).
- <sup>119</sup> H.-D. Jakubke, Peptide: Chemie und Biologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 323 (1996).
- <sup>120</sup> W. Yu, J. E. Vath, M. C. Huberty, S. A. Martin, Identification of the Facile Gas-Phase Cleavage of the Asp-Pro and Asp-Xxx Peptide Bonds in Matrix-Assisted Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, **65**, 3015-3023 (1993).
- <sup>121</sup> X-J Tang, P. Thibault, R. K. Boyd; Fragmentation Reactions of Multiply-Protonated Peptides and Implications for Sequencing by Tandem Mass Spectrometry with Low-Energy Collision-induced Dissociation, *Anal. Chemistry*, **65**, 2824-2834 (1993).
- <sup>122</sup> Lateinisch: "Was zu beweisen war". R. Gosciny, A. Uderzo; Der Kampf der Häuptlinge, *Asterix Band IV*, S. 19 (1966). Diese Redewendung geht ursprünglich auf den griechischen Mathematiker Euklid (365-300 v.Chr.) zurück, der damit seine Thesen zur Geometrie untermauerte.
- <sup>123</sup> S. Fang, T. Takao, Y. Stomi, W. Mo, Y Shimonishi; Novel Rearranged Ions Observed for Protonated Peptides Via Metastable Decomposition in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, **11**, 345-351 (2000).
- <sup>124</sup> K. M. Downard, K. Biemann; The Effect of Charge State and the Localization of Charge on the Collision-Induced Dissociation of Peptide Ions, *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, **5**, 966-975 (1994).
- <sup>125</sup> H.-D. Jakubke; Peptide: Chemie und Biologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 351 (1996).
- <sup>126</sup> J. B. Hurley, M. Spencer, G. A. Niemi, Rhodopsin phosphorylation and its role in photoreceptor function, *Vision Research*, **38**, 1341-1352 (1998).
- <sup>127</sup> D. I. Papac, J. E. Oatis Jr, R. K. Crouch, D. R. Knapp; Mass Spectrometric Identification of Phosphorylation Sites in Bleached Bovine Rhodopsin, *Journal of the American Chemical Society*, **32**, 5930-5934 (1993).
- <sup>128</sup> J. T. Stults, J. Lai, S. McCune, R. Wetzel; Simplification of High-Energy Collision Spectra of Peptides by Amino-Terminal Derivatization, *Analytical Chemistry*, **65**, 1703-1708.
- <sup>129</sup> K. M. Downard, K. Biemann, Charging Behaviour of Highly-Basic Peptides During Electrospray Ionization. A Prediction for Protons, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **148**, 191-202 (1995).

- 
- <sup>130</sup> P. D. Schnier, W. D. Price, E. R. Williams; Modelling the Maximum Charge State of Arginine-Containing Peptide Ions Formed by Electrospray Ionization, *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, **7**, 972-976 (1996).
- <sup>131</sup> T. R. Covey, R. F. Bonner, B. I. Shushan, J. Henion; Rapid Communications in Mass Spectrometry, **2**, 249-256 (1988).
- <sup>132</sup> A. G. Harrison; The gas-phase basicities and proton affinities of amino acids and Peptides, *Mass Spectrometrical Reviews*, **190/191**, 209-230 (1997).
- <sup>133</sup> J. L. Sterner, M. V. Johnston, G. R. Nicol, D. P. Ridge; Apparent Proton Affinities of Highly Charged Peptide Ions, *J. Am. Soc. Mass Spectrometry*, **10**, 483-491 (1999).
- <sup>134</sup> C. J. Barinaga, C. G. Edmonds, H. R. Udseth, R. D. Smith; Sequence Determination of Multiply Charged Peptide Molecular Ions by Electrospray-ionization Tandem Mass Spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **3**, No. 5, 160-164 (1989).
- <sup>135</sup> B. L. Schwartz, M. M. Bursey; Some proline substituent effects in the tandem mass spectrum of protonated pentaalanine, *Biological Mass Spectrometry*, **21**, 92-96 (1992).
- <sup>136</sup> J. A. Loo, H. R. Udseth, R. D. Smith; *Biomed. Environ. Mass Spectrometry*, **17**, 411-414 (1988).
- <sup>137</sup> B. B. Willard, M. Kinter; Factors Affecting Amino Acid Sequence Information in CID-Spectra of Triply Charged Tryptic Peptides with an Internal Histidine, *Proceedings of the ASMS-Conference*, Long Beach CA, 2000.
- <sup>138</sup> S. T. Steinborner, J. H. Bowie; The Negative Ion Mass Spectra of  $[M-H]^-$  Ions derived from Caeridin and Dynastin Peptides. Internal Backbone Cleavages directed through Asp and Asn residues, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **11**, 253-258 (1997).
- <sup>139</sup> M. C. Sullards, J. A. Reiter; Primary and Secondary Locations of Charge Sites in Angiotensin II  $(M+2H)^{2+}$  Ions Formed by Electrospray Ionization, *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, **11**, 40-53 (2000).
- <sup>140</sup> M. S. Cárdenas, E. van der Heeft, A. P. J. M. de Jong; On-line Derivatization of Peptides for Improved Sequence Analysis by Micro-column Liquid Chromatography coupled with Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **11**, 1271-1278 (1997).
- <sup>141</sup> B. Asamoto (Ed.); *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry: Analytical Applications*, Wiley & Sons, (1991).

# Lebenslauf

## Guido Sonsmann

- Geburtsdatum: 17.10.1971
- Geburtsort: Münster
- Familienstand: ledig

### SCHULAUSBILDUNG

1978 – 1982 Albert Schweitzer Grundschule in Kerpen-Brüggen  
1982 – 1998 Vile-Gymnasium in Erftstadt-Liblar  
1998 – 1991 Stiftsgymnasium in Xanten

### ERSATZDIENST

1991 – 1992 Altenpflegestation des diakonischen Altenzentrums, Xanten

### HOCHSCHULAUFBILDUNG

1992 – 1998 Universität zu Köln, Studiengang Chemie  
*Diplom Chemiker (Note gut)*

- Diplomarbeit am Institut für Biochemie, Titel: Aufreinigung und Charakterisierung der extrazellulären Bindungsdomäne des Keratinozyten-Wachstumsfaktor Rezeptors aus *Mus musculus*

1998 – 2000 Universität zu Köln  
*Doktor der Naturwissenschaften*

- Massenspektrometrische Analyse von Peptiden und Peptidderivaten – Steuerung der Fragmentierung einfach und mehrfach geladener Ionen durch gezielte chemische Modifikationen