

Strukturaufklärung komplexer Ionen in der Gasphase

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Katrin Peckelsen

aus Duisburg

Köln, 2018

1. Berichtersteller:
Prof. Dr. Mathias Schäfer
Department für Chemie
Institut für Organische Chemie
Universität zu Köln

2. Berichtersteller:
Prof. Dr. Stephan Schlemmer
Fachgruppe Physik
I. Physikalisches Institut
Universität zu Köln

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2018

Für meine Mutter

“There’s no chance, no destiny, no fate, that can circumvent or hinder or control the firm resolve of a determined soul.”

Ella Wheeler Wilcox

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Mathias Schäfer von April 2014 bis Dezember 2017 am Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln angefertigt.

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht, oder waren Gegenstand von Tagungsbeiträgen.

Publikationen:

Katrin Peckelsen, Jonathan Martens, Lisa Czypiel, Jos Oomens, Giel Berden, Dirk Gründemann, Anthony J.H.M. Meijer, Mathias Schäfer
Ergothioneine and related Histidine Derivatives in the Gas Phase: Tautomer Structures determined by IRMPD Spectroscopy and Theory,
Physical Chemistry Chemical Physics **2017**, *19*, 23362 - 23372.

Mathias Schäfer, Katrin Peckelsen, Mathias Paul, Jonathan Martens, Jos Oomens, Giel Berden, Albrecht Berkessel, Anthony J.H.M. Meijer
Hydrogen Tunneling Above Room Temperature: A Gas- Phase Study of Phenylhydroxycarbene,
Journal of the American Chemical Society **2017**, *139*, 5779-5786.

Katrin Peckelsen, Jonathan Martens, Giel Berden, Jos Oomens, Robert C. Dunbar, Anthony J.H.M. Meijer, Mathias Schäfer
Gas-Phase Complexes of Ni(II) and Ca(II) with Deprotonated Histidylhistidine: A Model Case for Polyhistidyl-Metal Binding Motifs,
Journal of Molecular Spectroscopy **2017**, *332*, 38-44.

Vorwort

Poster und Vorträge:

Katrin Peckelsen, Mathias Paul, Martin Breugst, Jörg-M. Neudörfl, Jonathan Martens, Giel Berden, Jos Oomens,, Anthony J.H.M. Meijer, Albrecht Berkessel, Mathias Schäfer

IR Ion Spectroscopy of Key Intermediates of Carbene-Catalyzed Umpolung: Breslow Intermediates vs. Keto Tautomers

51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, DGMS, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 11.-15. März 2018.

Katrin Peckelsen, Jonathan Martens, Lisa Czypiel, Jos Oomens, Giel Berden, Dirk Gründemann, Anthony J. H. M. Meijer, Mathias Schäfer

Ergothioneine and related histidine derivatives in the gas phase: tautomer structures determined by IRMPD spectroscopy

FELIX User Meeting, Radboud Universität, Nijmegen, 1.-3. November 2017.

Katrin Peckelsen, Anthony J. H. M. Meijer, Jos Oomens, Giel Berden, Jonathan Martens, Rob C. Dunbar, Mathias Schäfer

Gas-phase complexes of Ni²⁺ and Ca²⁺ with Histidine: Examination of Changes in Binding Motifs via Infrared Multiple Photon Dissociation (IRMPD) Spectroscopy

Isolated Biomolecules and Biomolecular Interactions, IBBI, Oxford UK, 10.-15. April 2016.

Katrin Peckelsen, Jonathan Martens, Jos Oomens, Giel Berden, Robert C. Dunbar, Anthony J. H. M. Meijer, Mathias Schäfer

Examination of Gas-phase Cationic Ions of Histidine Complexes via Infrared Multiple Photon Dissociation (IRMPD) Spectroscopy

49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, DGMS, Universität Hamburg, 28. Februar-2. März 2016.

Vorwort

Katrin Peckelsen, Lisa Czypiel, Jos Oomens, Giel Berden, Anthony J.H.M. Meijer, Mathias Schäfer

Examination of Gas-phase Cationic Ions of Ergothionine and Related Derivatives via Infrared Multiple Photon Dissociation (IRMPD) Spectroscopy

Fachgruppentreffen der Fachgruppe FTMS und hochauflösende Massenspektrometrie, Universität Bonn, 16.-18. September 2015.

Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten Histidin und in der Natur vorkommende Derivate, sowie deren Interaktion mit Kationen untersucht werden. Für die Untersuchung wurden Massenspektrometrie, computerchemische Modellierungen, sowie IRMPD-Experimente mit einem Freie-Elektronen-Laser durchgeführt.

Zunächst sollte Ergothionein, ein Thiourea-Derivat von Histidin, welches ein Schwefelatom am Imidazol-Ring trägt, sowie dessen natürlicher Vorläufer Hercynin, ein Trimethylbetain von Histidin, untersucht werden. Ergothionein kann sowohl als Thiourea-Derivat, als auch als das entsprechende Thiol vorliegen. Zunächst sollte Ergothionein in seiner protonierten Form und anschließend als Natrium-Addukt untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass Ergothionein in der Gasphase als Thion vorliegt, obwohl Rechnungen zeigen, dass die Thiol-Struktur in der Gasphase energetisch günstiger ist.

Des Weiteren sollte die Struktur von Nickel-Histidin-Komplexen in der Gasphase untersucht werden. Dabei wurde festgestellt, dass ein Histidin-Molekül nicht ausreicht, um Nickel adäquat zu komplexieren. Deshalb wurde die Studie auf Komplexe mit zwei Histidin-Liganden ausgeweitet. Um den Einfluss des Kations, in Bezug auf Ionenradius und Ligandenaffinität, auf die Struktur der Komplexe zu untersuchen, wurden zusätzlich Calcium-Komplexe studiert. Es konnte gezeigt werden, dass drei ähnlich stabile Konformere des Nickel-Komplexes in der Gasphase simultan vorliegen. Für Calcium konnte keine so eindeutige Zuordnung getroffen werden. Um die Flexibilität der Komplexe einzuschränken und eine neue Bindungsstelle zu schaffen, wurde das Histidin-Dipeptid (HisHis) synthetisiert und dieses als Ligand für Nickel und Calcium verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass der Nickel-Komplex eine Iminolat-Struktur einnimmt, Calcium hingegen eine „Charge Solvation“-Struktur, bei der C-Terminus deprotoniert ist, die Peptid-Bindung jedoch nicht.

Als weitere Modifikation des Histidins sollte die Phosphorylierung ($\text{N-PO}_3\text{H}^-$), als Mimikry für die post-translationale Modifikation von Peptiden, untersucht

Kurzzusammenfassung

werden. Für diese Studie wurde Histidin, Hercynin und HisHis untersucht. Durch die geringe Stabilität von Phosphor-Stickstoff Bindungen gestaltete sich die Generierung der Moleküle und deren Verwendung in der ESI-MS als äußerst schwierig. Durch die Anzahl möglicher Phosphorylierungsstellen in den Molekülen, nahm diese Studie zudem viel Rechenaufwand ein.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Kombination von MS, IRMPD und Computerchemie geeignet ist, um solch komplexe Fragestellungen zu bearbeiten.

Abstract

In the presented thesis Histidine and its natural derivatives, as well as their interaction with cations was studied. For this purpose a combination of mass spectrometry, computational modelling and IRMPD-Spectroscopy with a free electron laser was used.

Ergothioneine as a thiourea derivative of histidine, containing a sulfur atom on the imidazolring, as well as its natural precursor hercynine have been examined, with special attention on the thione/thiol equilibrium in ergothioneine. Furthermore, the presence of a physiological important alkali metal like sodium on this thione/thiol equilibrium was investigated. It was demonstrated that ergothioneine adopts a thiol structure although calculation predicted it as energetically disfavored.

Furthermore, the structure of nickel histidine complexes was investigated in the gas phase. It turns out that one histidine is not sufficient to accommodate a nickel cation properly, but two are. Complexes with calcium and two histidine ligands have been examined, too. Nickel forms three similar stable complexes in gas phase that are present simultaneously. For the calcium histidine complexes a properly structural assignment was not possible. To give the ligands a more rigid form, the histidine dipeptide was synthesized and incorporated in the complexes. It was possible to demonstrate, that the HisHis-Ni complex adopts an iminolate structure whereas the calcium favors a charge solvation complex.

As prominent post translational modification phosphorylation of histidine and the dipeptide was studied. Here it turned out to be difficult to match theory and experiment, as the molecules aren't stable and there are too many possible structures.

In general, the combination of the afore mentioned methods gives first insights into such complex issues.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Elektrospray Ionisation (ESI).....	2
1.1.1 Bildung der Ionen	2
1.2 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS).....	5
1.2.1 Collision Induced Dissociation (CID)	7
1.2.2 Infrared multiple photodissociation (IRMPD)	8
1.2.2.1 Intramolecular Vibrational Redistribution IVR	10
1.3 Theoretische Methoden	11
1.3.1 Konformationsanalyse	13
1.3.2 Molekülmechanik	13
1.3.3 Quantenchemische Grundlagen.....	14
1.3.3.1 <i>Ab initio</i> Methoden.....	16
1.3.3.2 Semi-Empirische Methoden	17
1.3.3.3 Dichtefunktionaltheorie	17
1.3.3.4 Basissätze.....	19
1.3.3.5 Berücksichtigung von Lösungsmittelleffekten	21
2 Aufgabenstellung.....	22
3 Ergebnisse und Diskussion.....	24
3.1 Ergothionein und anverwandte Histidin Derivate	24
3.1.1 IRMPD Spektroskopie und Computerchemische Untersuchungen.....	25
3.2 Histidin-Metall Komplexe	43
3.2.1 $[\text{Ni}^{2+}(\text{His-H})]^+$	44
3.2.2 $[\text{M}^{2+}(\text{His})(\text{His-H})]^+$	45
3.2.2.1 IRMPD Spektroskopie und Computerchemische Untersuchungen.....	46
3.2.3 $[\text{M}^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$	54
3.2.3.1 IRMPD Spektroskopie und Computerchemische Untersuchungen.....	55
3.3 Phosphorylierung von Histidin und seinen Derivaten	62
3.3.1 pHis	65
3.3.2 pHis+Nickel	68
3.3.3 Phosphorylierung von Hercynin	72
3.3.4 pHisHis	74
4 Zusammenfassung und Ausblick	77

5 Experimenteller Teil.....	81
5.1 Synthese der Anaylten.....	81
5.1.1 L-Ergothionein	81
5.1.2 Darstellung von Hercynin und <i>Nε</i> -Methyl Hercynin.....	82
5.1.3 Darstellung des $[\text{Ni}^{2+}(\text{His})(\text{His-H})]^+$ Komplexes	84
5.1.4 Darstellung des $[\text{Ca}^{2+}(\text{His})(\text{His-H})]^+$ Komplexes.....	84
5.1.5 Darstellung des $[\text{Ni}^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$ Komplexes.....	86
5.1.6 Darstellung des $[\text{Ca}^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$ Komplexes	86
5.1.7 Darstellung von pHis.....	87
5.1.8 Darstellung von pHis+Nickel.....	88
5.1.9 Darstellung von pHercynin	89
5.1.10 Darstellung von pHisHis.....	89
5.2 Massenspektrometrie	90
5.3 IRMPD-Experimente	91
5.3.1 FTICR.....	91
5.3.2 Quadrupol Ionenfalle.....	92
5.4 Computerchemische Berechnungen	93
5.4.1 Ergothionein und anverwandte Histidin Derivate.....	93
5.4.2 Nickel und Calcium Komplexe	94
5.4.3 Phosphorylierte Molekül-Ionen.....	95
6 Anhang.....	96
7 Literaturverzeichnis	115
8 Abkürzungsverzeichnis	125
Danksagung	127
Erklärung.....	129
Lebenslauf	130

1 Einleitung

In der Natur können Proteine mit mehreren, aufeinanderfolgenden Histidin-Resten häufig gefunden werden. Dazu zählen Schlangengifte, Chaperone oder auch intrinsisch ungeordnete Proteine.¹⁻³ Obwohl die Funktion dieser Histidinreichen Domänen unbekannt ist, stellt Histidin durch seine Struktur eine gute Bindungsstelle für Metallkationen dar.^{1,4} Durch oxidativen Stress kann Histidin in Oxo-Histidin umgewandelt werden.^{5,6} Es wird vermutet, dass so modifizierte Peptide potentielle Biomarker für Alzheimer sind, wobei die genaue Funktion bisher unklar ist.^{7,8} Mittels Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) können solche Komplexe oder Proteine als Ionen in die Gasphase transportiert werden und das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) bestimmt werden. Ein direkter Einblick in die Konformation ist so jedoch nicht möglich. Die Untersuchung solcher Ionen in der Gasphase lässt Rückschlüsse auf deren intrinsische Eigenschaften zu. Durch das Fragmentierungsverhalten können indirekt Informationen über die Struktur des Moleküls gesammelt werden. Die Fragmentierung kann durch Stöße des Ions mit Neutralgasteilchen induziert werden (Collision Induced Dissociation, CID). Mittels Photodissoziations-Spektroskopie (Infrared Multiple Photodissociation Spectroscopy, IRMPD) können auch Strukturen von Konformeren ermittelt werden.⁹⁻¹² Dabei werden die Vorläuferionen durch Aufnahme von Photonen angeregt und fragmentieren, wenn die Dissoziations-Schwelle erreicht ist. Auf diese Weise kann der Einfluss von Metallionen oder Lösungsmitteln auf die Konformation untersucht werden. Durch Vergleich der erhaltenen Spektren mit quantenchemischen Berechnungen können auch Rückschlüsse auf die Bindungsstellen mit Metallen oder intramolekulare Wasserstoffbrücken geschlossen werden, da diese durch Stärkung oder Schwächung der Bindung Einfluss auf die entsprechende Bandenlage haben.^{13,14} Da es sich bei den Studien um Moleküle in der Gasphase handelt, können die computerchemischen Rechnungen auch so ausgeführt werden. Dies bietet den

Vorteil, dass elektrostatische Interaktionen der Moleküle mit dem Lösungsmittel vernachlässigt werden können und so die intrinsischen Eigenschaften der Moleküle untersucht werden können. Im Folgenden werden die für die Aufklärung der Ionenstruktur in der Gasphase verwendeten Methoden näher erläutert.

1.1 Elektrospray Ionisation (ESI)

Bei der Elektrospray-Ionisation (ESI) werden Ionen unter atmosphärischem Druck (atmospheric pressure ionization, API) erzeugt.¹⁵⁻¹⁷ Mittels ESI lassen sich große, polare Moleküle (z.B. Proteine) aus einer verdünnten Analytlösung in die Gasphase eines Massenspektrometers einbringen. Das Lösungsmittel wird beim Phasentransfer verdampft, dabei wird Energie verbraucht, was sich in der Kühlung der Analytmoleküle widerspiegelt. Diese gelangen so intakt oder mit nur geringer Fragmentierung in die Gasphase.¹⁶ Die ESI zählt daher zu den sogenannten „sanften“ Ionisierungstechniken.

1.1.1 Bildung der Ionen

Für die Bildung von Ionen wird ein kontinuierliches Spray benötigt. Die Analytlösung tritt aus einer elektrisch leitenden Kapillare aus, die sich in geringem Abstand (ca. 1-3 cm) zu einer Gegenelektrode befindet.¹⁸ Die Kapillare wird dabei in Bezug auf die Gegenelektrode auf hohem Potential gehalten (3-4 kV). Die Lösung wird am Ende der Kapillare einem starken elektrischen Feld von 10^6 V/m ausgesetzt. Dies bedingt eine Ladungstrennung innerhalb der Lösung. Dadurch kommt es zu einer Deformation des Meniskus der Analytlösung und zur Bildung eines Konus. Dieser wird auch als Taylor-Konus (vgl. Abbildung 1; Seite 4) bezeichnet.¹⁹ Wird eine positive Hochspannung an die ESI-Kapillare angelegt, werden positive Ionen erhalten. Diese positiv geladenen Ionen driften an die Oberfläche der Flüssigkeit, welche

aus der Kapillare austritt, negativ geladenen Ionen jedoch davon weg (in Abbildung 1 durch kleine Pfeile an den Ladungen dargestellt). Durch die Akkumulation der positiven Ladung an der Oberfläche bildet sich an der Spitze des Taylor-Konus sich ein feiner Flüssigkeitsstrahl, welcher in Richtung der Gegenelektrode strömt. Aufgrund einer hohen gleichsinnigen, in diesem Fall positiven, Überschussladung an der Oberfläche des Strahls zerfällt dieser schnell in kleine Tröpfchen, welche durch die Coulomb-Abstoßung auseinanderdriften. Die verbleibenden Lösungsmittel-moleküle verdampfen, wodurch die Ladungsdichte an der Oberfläche der Tröpfchen weiter steigt. Sobald das Rayleigh-Limit, also der Punkt, an dem die elektrostatische Abstoßung der Ionen die Oberflächenspannung des Tröpfchens übersteigt, erreicht ist, zerfallen die Tröpfchen in kleinere Tröpfchen unterschiedlicher Größe (uneven fission).¹⁸ Für die Bildung von Ionen aus solchen Mikrotropfen werden zwei Modelle diskutiert. Die 1968 von *Dole et. al.* entwickelte Theorie des geladenen Rückstandes (charged residue model CRM) geht davon aus, dass durch Verdampfen aller Lösungsmittelmoleküle aus den Mikrotropfen desolvatisierte Analytationen zurückbleiben.^{15,20} Es wird davon ausgegangen, dass dieses Modell eine große Rolle bei Makromolekülen oder nicht-kovalent verknüpften Proteinkomplexen spielt.²¹ Das Ionen-Emissions-Model (ion evaporation model, IEM) hingegen postuliert, dass ein einzelnes Ion von der Oberfläche eines Mikrotropfen austritt.^{22,23} Dies wird möglich, wenn die Feldstärke, auf der Oberfläche der Tropfen durch das Verdampfen von Lösungsmittel, zunimmt und die Coulomb-Abstoßung innerhalb des Tropfens die Oberflächenspannung übersteigt.²⁴ Das IEM spielt vor allem bei kleineren Molekülen eine Rolle.

Die in Abbildung 1 (Seite 4) gezeigte ESI-Quelle kann auch als Elektrolysezelle verstanden werden, da die Probeneintrittsblende (orifice) und die ESI-Kapillare durch das elektrisch geladene Spray leitend miteinander verbunden sind.²⁵

Die entstehenden Kationen werden durch Elektronen aus der Hochspannungsquelle reduziert und Anionen in der Spraykapillare oxidiert. Der

dabei fließende Strom wird als „Spray Current“ bezeichnet und stellt eine wichtige Größe dar. Der Spray Current hängt von der elektrischen Leitfähigkeit des Lösungsmittels ab, welche proportional zur Elektrolyt-Konzentration ist. Bei niedriger Analyt-Konzentration ist der Spray Current konstant, da er von der Elektrolyt-Konzentration beeinflusst wird.²⁶ Bei zu hohen Analyt- oder Elektrolyt-Konzentrationen kommt es jedoch zu elektrischen Entladungen, welche sowohl der Kapillarspitze als auch der Geräteelektronik schaden können.²⁷

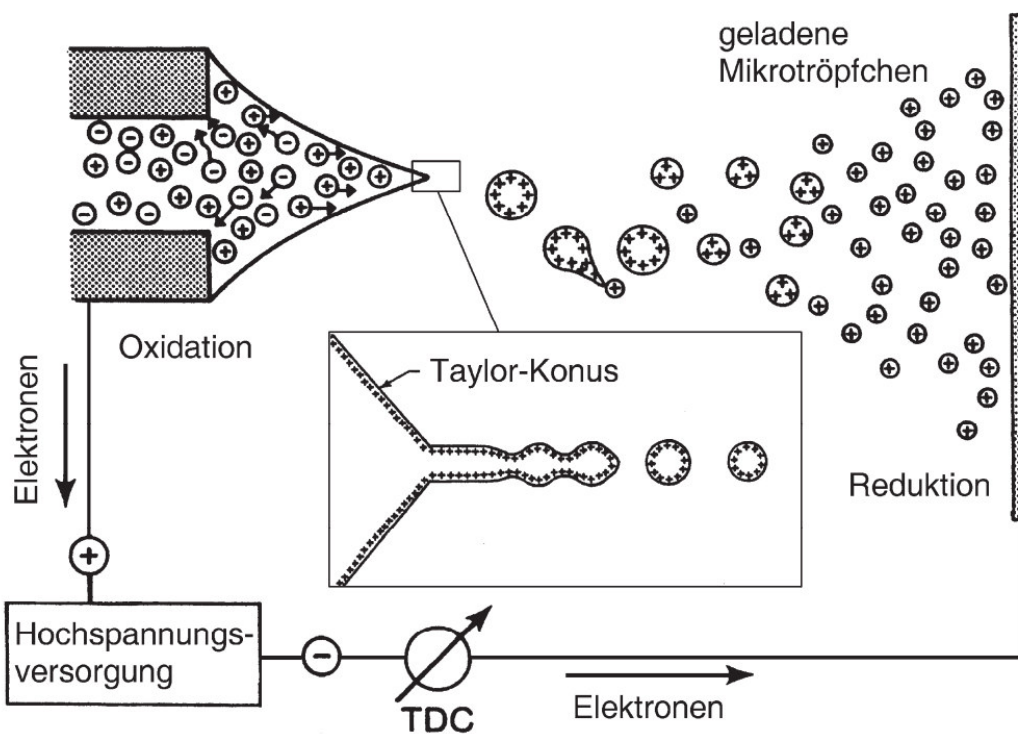


Abbildung 1. Schematischer Aufbau einer ESI-Quelle im positiven Ionen Modus. Zu sehen sind der Taylor-Konus, die Ionen-Emission aus dem Flüssigkeitsstrahl, sowie dessen Zerfall in ein kontinuierliches Spray.^{18,27}

Bei der Elektrospray-Ionisation hat das Lösungsmittel einen großen Einfluss auf die Bildung der Ionen. Es wurde gezeigt, dass die Art des Lösungsmittels die Struktur des Moleküls in der Gasphase beeinflusst.²⁸ Zudem verkomplizieren Lösungsmittelmoleküle oder Gegenionen das Verständnis von Reaktionen in Lösung.²⁹ Ein Gas, oder Ionen in der Gasphase, unterscheiden sich von einer Flüssigkeit dadurch, dass die Moleküle weit voneinander entfernt sind, wodurch der Einfluss von zwischenmolekularen Wechselwirkungen gering

ist.³⁰ In einem idealen Gas gibt es keine Wechselwirkungen zwischen Teilchen und deren Verteilung im Raum ist zufällig. In der Realität existieren aber anziehende und abstoßende Kräfte, welche Einfluss auf das Verhalten von Teilchen in der Gasphase haben.³⁰ Da der Einfluss von z.B. Coulomb Interaktionen nur gering ist, eignen sich Studien von „nackten“ Ionen in der Gasphase um kinetische Studien von Reaktionen durchzuführen, da ohne direkten Lösungsmiteleinfluss die intrinsischen Eigenschaften von Molekülen untersucht werden können.³¹ Aufgrund von Coulomb Wechselwirkungen der untersuchten Ionen, sowie der Abwesenheit von Gegenionen und Lösungsmitteln sind die isolierten Ionen in der Gasphase allerdings reaktiver als in der kondensierten Phase. Durch diese Unterschiede ist eine direkte Übertragung der Ergebnisse von Gasphasen-Studien auf Studien in Lösung nicht ohne Einschränkung möglich.³¹ Es wird daher diskutiert, wie sinnvoll es ist, um eine ionische Reaktion in Lösung zu verstehen, diese in der Gasphase zu untersuchen.³² Unter diesem Gesichtspunkt muss auch berücksichtigt werden, dass nicht immer die computerchemisch vorhergesagten Strukturen in der Gasphase vorliegen, sondern auch Strukturen aus der Lösung durch kinetische Hemmung in die Gasphase übertragen werden können.¹¹

1.2 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

Bei der Tandem-Massenspektrometrie sind mehrere Massenanalysatoren hintereinandergeschaltet. So wird es möglich Spektren von Produkt-Ionen, eines über sein m/z -Verhältnis selektierten Vorläufer-Ions, zu generieren. Bei der Tandem-MS wird zwischen „in time“ und „in space“ unterschieden.²⁷ Bei der Tandem-in-space-MS sind zwei räumlich voneinander getrennte Massenanalysatoren vorhanden. In dem ersten Geräteabschnitt können Vorläufer-Ionen nach ihrem m/z -Verhältnis isoliert werden. Die Ionen werden anschließend in ein weiteres Segment überführt. Dort können die Vorläufer-Ionen aktiviert werden. Dies kann auf verschiedene Weisen geschehen: durch

Stöße mit Neutralteilchen (collision induced dissociation, CID)³³, Photonen (infrared multiple photon dissociation, IRMPD)^{10,12}, Elektronen (electron capture dissociation, ECD)^{9,34} oder mit der Wand (surface induced dissociation, SID).^{35,36} Die so erhaltenen Produkt-Ionen werden in den zweiten Massenanalysator überführt und können dort analysiert werden. Bei der Tandem-in-time-MS finden alle eben beschriebenen Prozesse am gleichen Ort, aber zeitlich nacheinander statt.²⁷

Damit die Kopplung einer ESI-Quelle mit einem Massenspektrometer gelingt, muss ein differenziell gepumptes System vorhanden sein. Die Erzeugung der Ionen erfolgt unter atmosphärischem Druck, wohingegen die Detektion im Analysator Hochvakuum benötigt. In Abbildung 2 ist ein schematischer Aufbau eines ESI-Interfaces zu sehen. Würde das erzeugte Aerosol direkt in das Hochvakuum überführt werden (von links in Abbildung 2, nach ganz rechts) würden die Ionen aufgrund der adiabatischen Expansion ausfrieren. Um dies zu verhindern, wird ein heißer Stickstoffgegenstrom oder ein beheizbare Transferkapillare verwendet. Durch die Transferkapillare gelangt das Aerosol aus der unter Atmosphärendruck stehenden Sprayzone in die erste Pumpstufe (Abbildung 2 in der Mitte). Dort breitet sich das Gas über eine Überschall-expansion aus und der Großteil des Gases wird abgepumpt. Nur ein kleiner Teil des Gases wird durch eine weitere Öffnung, den sogenannten Skimmer, in den Hochvakuumbereich überführt und dort analysiert.²⁷

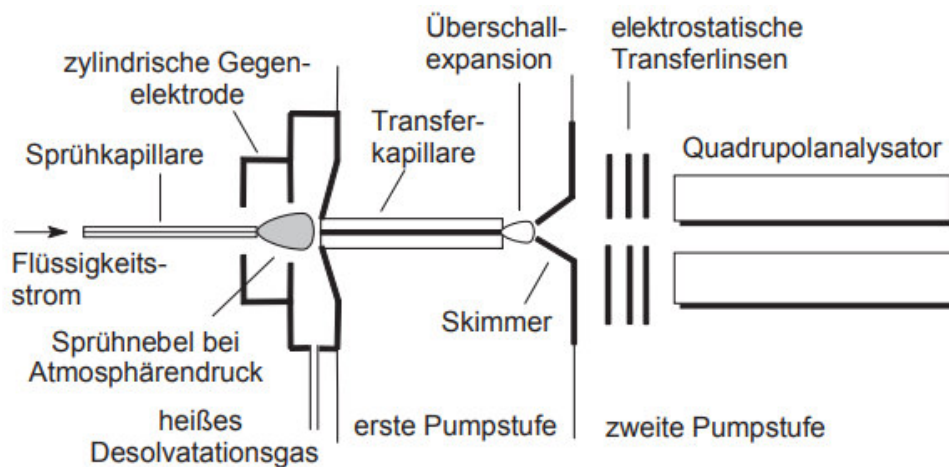


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer der ersten Elektrospray-Ionisationsquellen.¹⁶

Die Arbeitsgruppe um *John Fenn* konnte eine solche Schnittstelle etablieren und wurde 2002 für diese Entwicklung mit dem Nobelpreis in Chemie ausgezeichnet.³⁷ Diese Kombination erlaubt den Zugang zu polaren Verbindungen in der Gasphase, erlaubt aber noch keine Rückschlüsse auf die Struktur. Für die Strukturaufklärung der erhaltenen Ionen wurden Methoden entwickelt, bei denen die Ionen in der Gasphase aktiviert werden (vgl. vorheriger Abschnitt). In dieser Arbeit wurden die Ionen mittels CID oder IRMPD untersucht. In den folgenden Kapiteln sollen diese Methoden genauer erläutert werden.

1.2.1 Collision Induced Dissociation (CID)

Die Fragmentierung von Ionen in der Gasphase durch Stöße mit neutralen Atomen oder Molekülen wird in der Massenspektrometrie für verschiedene Zwecke verwendet.³⁸ Durch die sanfte Ionisierung beim ESI-Prozess, gelangen die Analytmoleküle intakt oder mit nur geringer Fragmentierung in die Gasphase, wodurch keine Information über die Struktur erhalten werden kann.¹⁶ Die stoßinduzierte Dissoziation (collision induced dissociation, CID) ermöglicht es, stabile Vorläuferionen zu fragmentieren. In diesem zweistufigen Prozess werden die Ionen zunächst durch eine oder mehrere Kollisionen mit einem Neutralgasteilchen aktiviert und zerfallen anschließend unimolekular.³⁸ Wie stark die Ionen fragmentieren hängt dabei von der bei der Aktivierung übertragenen kinetischen Energie ab. Die relative kinetische Energie der Kollisions-Partner (E_{CM}), welche auch als Stoßenergie im Schwerpunktsystem (center-of-mass collision energy) bezeichnet wird, hängt von der kinetischen Energie des Ions im Laborsystem (E_{Lab}), sowie den Massen der beteiligten Partner ab. Formel 1 zeigt den Zusammenhang:

$$E_{CM} = E_{Lab} \left(\frac{m_N}{m_N + m_{AB}} \right) \quad (1)$$

Dabei ist m_N die Masse des Neutralteilchens und m_{AB} die Masse des Ions. Für m_N wird angenommen, dass sich das Neutralteilchen in Ruhe befindet. Aus der Formel geht hervor, dass die Stoßaktivierung für Ionen hoher Masse, bei Verwendung von Neutralteilchen mit geringer Masse, wenig effektiv ist, wenn es nur zu einem Stoß kommt. Deshalb wird der Druck in den Stoßbereichen ausreichend hoch gehalten, um sicherzustellen, dass mehrere Kollisionen stattfinden.³⁸ Früher wurden solche Experimente in Stoßkammern durchgeführt, wohingegen heutzutage, abhängig vom Gerätetyp z.B. RF-only Quadrupole oder die Ionenfallen selber verwendet werden.^{27,39} Als Stoßgase werden z.B. Helium, Stickstoff oder Argon verwendet.

1.2.2 Infrared multiple photodissociation (IRMPD)

Bei der klassischen Infrarot-Spektroskopie absorbiert die Probe Teile des eingestrahlten Lichtes. Es wird also die Änderung der Intensität beim Probendurchgang gemessen.⁴⁰ In einem Massenspektrometer ist die Dichte an Ionen, aufgrund der gleichsinnigen Ladung dieser, zu gering, als dass eine Abschwächung der Intensität messbar wäre.⁴¹ Nichtsdestotrotz ist es möglich IR-Spektren durch Photodissoziation von Ionen mittels durchstimmbaren Lasern zu generieren. Die Energie von einem IR-Photon ist dabei nicht ausreichend um eine Dissoziation zu induzieren. Bei der IRMPD werden mehrere Photonen resonant absorbiert und die Energie statistisch über das Molekül verteilt, bis die Dissoziationsschwelle erreicht wird und das Ion zerfällt. Die Randomisierung der Energie wird als „intramolecular vibrational redistribution“ (IVR) bezeichnet und wird im nachfolgenden Kapitel näher erläutert. Zerfällt ein Molekül, so entstehen Fragmentionen mit einem vom Vorläuferion verschiedenem m/z -Verhältnis. Das IRMPD-Spektrum ergibt sich aus dem Verhältnis der Intensität der entstehenden Fragmentionen und der Intensität aller Ionen in Abhängigkeit der Energie der absorbierten Photonen. Das Verhältnis der Ionen wird als IRMPD Yield bezeichnet und kann über Formel 2 ausgedrückt werden⁴²:

$$IRMPD\ Yield = \frac{\Sigma(I_{Fragmentationen})}{\Sigma(I_{Fragmentationen} + I_{Vorläuferionen})} \quad (2)$$

In dieser Arbeit wurden zur Erzeugung der Photonen ein „Freie-Elektronen-Laser“ (FEL) sowie ein „optisch parametrischer Oszillator“ (OPO) verwendet. Mittels eines FEL kann der mittlere Infrarot-Bereich von 500 bis 200 cm^{-1} abgedeckt werden. Solche Experimente werden als „FELIX“ Experimente (Free Electron Laser for Infra Red Experiments) bezeichnet. Mit dem OPO kann der Bereich von 2500-3500 cm^{-1} untersucht werden. Im Folgenden werden die Funktionsweise eines FEL und eines OPO erklärt.

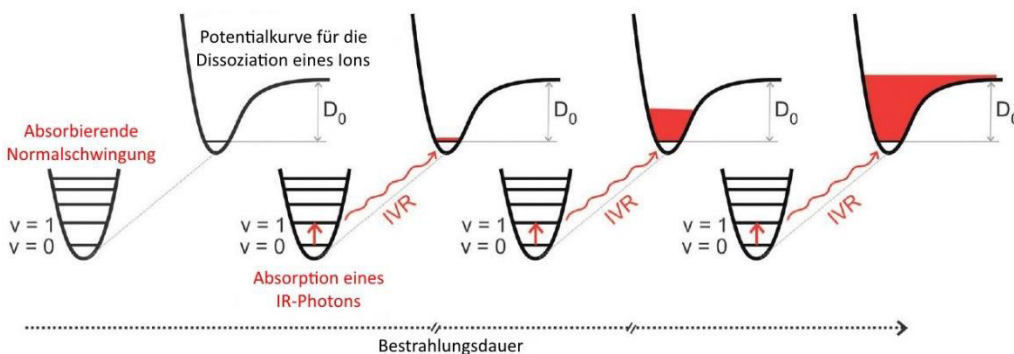
Da Elektronen über das elektromagnetische Spektrum quasi transparent sind, eignen sie sich besonders gut als Laser Medium. In einem FEL werden freie Elektronen auf relativistische Geschwindigkeit, also nahe an Lichtgeschwindigkeit, beschleunigt und in einen Undulator injiziert. Ein Undulator besteht aus periodisch alternierend angeordneten Magneten. Durch diese alternierende Form werden die Elektronen im Undulator auf eine sinuswellen-artige Form gezwungen. Auf Grund ihrer Geschwindigkeit emittieren die Elektronen bei jeder Richtungsänderung Strahlung, die so genannte Bremsstrahlung. Diese Strahlung muss kohärent zur Bewegung der Elektronen sein. Da aber die emittierte Strahlung einen linearen Weg beschreibt, während die Elektronen sich wellenförmig bewegen, muss der Undulator entsprechend eingestellt werden. Da nicht alle Elektronen in Phase emittieren, ist die entstehende Strahlung zunächst schwach. Um eine ausreichende Intensität der Strahlung zu erreichen, sind am Anfang und am Ende des Undulators Spiegel angebracht, welche die Strahlung reflektieren und so zu wiederholten Interaktionen mit den Elektronen führen. Um die Wellenlänge der Strahlung anzupassen wird der Abstand zwischen den Magneten im Undulator geändert.^{41,43}

Die Funktionsweise eines OPO beruht auf dem Prinzip der parametrischen Verstärkung. Dabei wird ein einfallender Laserstrahl durch einen doppeltbrechenden Kristall in zwei Lichtstrahlen mit unterschiedlicher

Frequenz aufgeteilt. Die Summe der beiden neuen Frequenzen entspricht dabei der Frequenz des einfallenden Strahls. Die Welle mit der höheren Frequenz wird „Signal“ und die andere „Idler“ Strahlung genannt. Entweder die Idler oder die Signal Strahlung wird nun durch einen Spiegel rückgekoppelt. Bei jedem Passieren des Kristalls verstärkt sich die resonante Welle. ⁴⁴

1.2.2.1 Intramolecular Vibrational Redistribution IVR

Wie bereits erwähnt, ist die Dichte der Analytmoleküle bei der MS zu gering, um eine Abschwächung der verwendeten Strahlung zu detektieren. Durch Photodissoziation ist es aber trotzdem möglich, IR-Spektren von Ionen zu erzeugen. Damit ein Ion durch IR Strahlung dissoziiert, müssen mehrere zehn bis hundert Photonen absorbiert werden. Die Absorption findet nicht über einen kohärenten Mechanismus statt, bei dem jedes absorbierte Photon die vibrationalen Stufen eines einzigen Potentialtopfes hochklettert. ⁴¹ Dieser Mechanismus hätte zufolge, dass der Laser nicht mehr in Resonanz mit dem angeregten Ion stünde, nachdem dieses ein Photon aufgenommen hat. Stattdessen wird die Energie eines absorbierten IR-Photons statistisch über alle Freiheitsgrade des Moleküls verteilt (intramolecular vibrational redistribution, IVR).



Schema 1. Sequenzieller Anregungs-Relaxationsmechanismus während der IRMPD Spektroskopie. ⁴⁵

In Schema 1 ist der Mechanismus der IVR zu sehen. Nach Aufnahme des ersten Photons und der Umverteilung der Energie, wird das nächste Photon im gleichen Übergang absorbiert. Es wird also wieder der Übergang von $v=0$ zu $v=1$ angeregt. Die Energie wird erneut in einem „Bad“ von vibrationalen Hintergrundzuständen gespeichert, wobei die innere Energie des Ions zunimmt. Dieser Vorgang wiederholt sich so oft, bis eine Energieschwelle D_0 erreicht wird, an der das Molekül dissoziiert.^{43,45} Da immer der gleiche Übergang angeregt wird, verschiebt sich die Frequenz der Absorption, da die innere Energie des Moleküls steigt.⁴⁶

Durch die statistische Umverteilung der Energie, „erinnern“ die Ionen sich nicht, welcher Schwingungsmodus ursprünglich angeregt wurde. Eine Schwingungsmodus-selektive Dissoziation wird daher nicht beobachtet.⁴⁷ Es wird also angenommen, dass Konformere auf die gleiche Weise fragmentieren, wenn die Isomerisierungsbarriere geringer ist als die Energieschwelle der Dissoziation.⁴⁸ Wenn kinetische oder thermodynamische Barrieren der Isomerisierung jedoch hoch genug sind, wird es möglich auch Strukturisomere zu unterscheiden.^{49,50}

1.3 Theoretische Methoden

In der modernen organischen Chemie hat die computerchemische Betrachtung von Molekülen in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Durch theoretische Betrachtungen können Eigenschaften in der Gasphase oder in Lösung vorausgesagt werden. Dazu gehören neben der Reaktivität und Selektivität auch spektroskopische Daten wie z.B. IR-, Raman- oder NMR-Spektren. Auf dem Gebiet der Strukturaufklärung, im Speziellen auch in der Gasphase, wurden in den letzten Jahren viele Studien veröffentlicht.⁵¹⁻⁵³ Dabei wurden vor allem Komplexe von Alkalimetallen (Na^+ , K^+) mit aromatischen Aminosäuren, die Dimere von Aminosäuren, wie Arginin oder Peptide wie

Bradykinin untersucht. Neben der Struktur können durch computerchemische Betrachtungen auch Rückschlüsse auf Liganden-Affinität oder Substrat-Katalysator Beziehungen geschlossen werden.⁵⁴

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Interpretation von experimentell erhaltenen Gasphasen-IR-Spektren unterschiedlicher Komplexe verschiedene computerchemische Studien durchgeführt. Ein Großteil der theoretischen Studien wurde an der Universität Sheffield von Anthony Meijer durchgeführt.

1.3.1 Konformationsanalyse

Moleküle können abhängig von ihrer Struktur unterschiedlich viele Konformationen annehmen. Die Anzahl möglicher Konformationen nimmt mit der Komplexität des Moleküls zu. Wird der Konformationsraum, also die Anzahl aller Konformationen, gegen die Energie aufgetragen, bildet sich die Energiehyperfläche (potential energy surface, PSE). Die PSE weist ein globales und mehrere lokale Minima, sowie Maxima auf. Für die Betrachtung elektronischer und struktureller Eigenschaften, muss sich das Molekül in einem solchen globalen Minimum befinden. Um die Konformere mit der niedrigsten Energie zu finden wird eine Konformationsanalyse durchgeführt. Wichtig für die Analyse ist dabei die Methode der Energieminimierung. Auf der einen Seite gibt es die Konformationssuche, welche sich ausschließlich mit der Suche nach Minima auf der PSE befasst. Auf der anderen Seite stehen Moleküldynamik und Monte-Carlo Simulationen, welche durch zufällige Variation von Torsionswinkeln auch energetisch ungünstige Zustände berücksichtigen.⁵⁵

1.3.2 Molekülmechanik

Bei der Molekülmechanik werden Kraftfelder eingesetzt, welche die Moleküle mit den klassischen Mitteln der Physik beschreiben. Bei Kraftfeld-Methoden werden die Moleküle als „Bälle“ betrachtet, welche durch „Federn“ miteinander verbunden sind. Die Federn repräsentieren dabei die Bindungen. Die Federkonstante kann durch ein harmonisches Potenzial beschrieben werden. Jedes Atom wird dabei als Ganzes betrachtet und nicht in Elektronen und Kern aufgeteilt. Für jeden Winkel, Dieder Winkel, Energiebeiträge nicht gebundener Atome, sowie Bindungslängen zwischen Atomen werden Kraftkonstanten angegeben.^{56,57} Die Energie dieser Beiträge wird durch Aufstellen mathematischer Formeln mit Konstanten und Variablen angegeben.

Die Summe aller Beiträge ist das Kraftfeld, welches die Gesamtenergie des Systems in Abhängigkeit von den Energiefunktionen und Konstanten ergibt. Solche Konstanten oder auch Parameter können durch spektroskopische Daten oder *ab initio* Rechnungen (s. Kapitel 1.3.3.1 *Ab initio*) erhalten werden. Bei der Parametrisierung werden sowohl die Atomtypen, als auch die Art der Bindung (einfach, doppel...) berücksichtigt.⁵⁸ Da viele Parameter auf experimentelle Daten zurückzuführen sind, sind Kraftfeld Methoden häufig speziell auf einen Molekültypen, wie Proteine, organische Moleküle oder auch Organo-Metall-Verbindungen zugeschnitten.⁵⁵ Für Biomoleküle werden z.B. AMBER⁵⁹, CHARMM^{60,61} oder GROMACS⁶² verwendet und für organische Moleküle MM2⁶³ oder MMFF⁶⁴.

1.3.3 Quantenchemische Grundlagen

Elektromagnetische Strahlung kann abhängig vom Experiment als Teilchen oder als Welle aufgefasst werden. Sie breitet sich mit Lichtgeschwindigkeit c aus und wird durch die Wellenlänge λ und die Frequenz ν über Formel 3 charakterisiert^{30,65}:

$$c = \lambda \cdot \nu \quad (3)$$

Wird die Strahlung als Teilchen beschrieben, muss die vom Max Planck entwickelte Quantentheorie berücksichtigt werden. Laut dieser kann elektromagnetische Strahlung nur in definierten Portionen absorbiert oder abgestrahlt werden. Jede dieser Portionen wird als Quant bezeichnet und deren Energie ist proportional zur Frequenz. Die Proportionalität wird über die Planck-Konstante h ausgedrückt^{30,65}:

$$\Delta E = h \cdot \nu \quad (4)$$

Auch Elektronen können aufgrund ihrer geringen Masse sowohl als Wellen als auch als Teilchen aufgefasst werden. Die Wellenlänge wird dabei über die de Broglie Beziehung definiert^{30,65}:

$$\lambda = \frac{h}{m \cdot v} \quad (5)$$

Dabei ist $m \cdot v$ der Impuls des Elektrons. Laut der Heisenbergschen Unschärfe Relation kann von einem kleinen Teilchen der Ort und der Impuls nicht gleichzeitig beliebig genau ermittelt werden. Ein Elektron wird daher besser über eine stehende Welle beschrieben. Dazu dient die Wellenfunktion ψ . Jeder Wellenfunktion kann eine definierte Energie zugeordnet werden und sie weist Knotenflächen auf. An diesen Knotenflächen ist die Wahrscheinlichkeitsdichte des Elektrons, welche über $|\psi|^2$ definiert ist Null. Die Ein-Elektron-Wellenfunktionen werden auch Orbitale genannt und können über die Schrödinger Gleichung berechnet werden.^{30,65}

In der Theorie kann mit der Quantenmechanik (QM) jede Eigenschaft eines Atoms oder Molekül bestimmt werden. Praktisch allerdings wurde die QM Gleichungen bisher nur für ein Ein-Elektronen System gelöst. Die zentrale Gleichung in der Quantenmechanik wurde 1926 von Erwin Schrödinger entwickelt:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (6)$$

Der Hamilton Operator \hat{H} setzt sich dabei aus den Operatoren für die kinetische Energie (\hat{T}) und der potenziellen Energie (\hat{V}) zusammen. Dahingegen repräsentiert E die Gesamtenergie des Systems, Ψ die Wellenfunktion. Für Mehr-Elektronen Systeme wurden verschiedene Näherungen entwickelt. Die von Born und Oppenheimer entwickelte Näherung betrachtet die Bewegung von Elektronen unabhängig von den Bewegungen der Atomkerne.⁶⁶ Diese Annahme beruht auf der Tatsache, dass die Kerne um ein vielfaches schwerer sind als die Elektronen. Dadurch erfahren die Elektronen eine größere

Beschleunigung als die Kerne, wodurch deren Bewegung auf einer anderen Zeitskala liegt. Die kinetische Energie der Kerne wird damit gleich Null gesetzt. Quantenmechanische Methoden werden im Allgemeinen in *ab initio*, semiempirische Ansätze und Dichtefunktionaltheorie unterteilt.

1.3.3.1 *Ab initio* Methoden

Das Hartree-Fock (HF) Verfahren basiert auf der Schrödinger Gleichung. Es finden sich lediglich Naturkonstanten und keine experimentellen Daten in dieser Methode. Die 1928 von Hartree entwickelte Theorie geht davon aus, dass die Elektron-Elektron Abstoßung durch ein effektives Feld einer Abstoßung ersetzt werden kann.⁶⁷ Die Hartree-Fock Gleichungen vereinfachen die ursprünglich zu lösende Schrödinger Gleichung, welche ein n-Elektronen Problem darstellt, in n Ein-Elektronen Probleme:

$$\hat{F}_i \varphi_i = \varepsilon_i \varphi_i \quad (7)$$

\hat{F} beschreibt den Fock-Operator, φ_i die Ein-Elektron-Wellenfunktion und ε_i die Orbitalenergie eines i-ten Orbitals. Da die Lösung der Gleichung nicht trivial ist, müssen die einzelnen Gleichungen iterativ gelöst werden, wobei die nicht betrachteten Orbitale als gemittelt Potential betrachtet werden. Durch diesen Ansatz wird in jedem Schritt die Wellenfunktion eines Elektrons korrigiert. Dies wird so lang wiederholt, bis sich φ_i nicht mehr verändert. Dabei entsteht ein selbst-konsistentes Feld (self consistent field, SCF). Die Gesamtenergie eines Systems kann auf diese Weise zu etwa 99% exakt bestimmt werden, da bei dem reinen HF-Formalismus nur ein elektronischer Grundzustand betrachtet wird. Da die Aufenthaltswahrscheinlichkeiten eines Elektrons aber auch mit denen der anderen korreliert, muss diese Ungenauigkeit berechnet werden. Diese Korrelationsenergie kann durch sogenannte post-HF-Verfahren angenähert werden. Dazu zählen die durch Möller und Plesset entwickelten störungstheoretischen Ansätze (MP2, MP3)⁶⁸ oder auch Coupled Cluster Ansätze (CCSD(T))⁶⁹.

1.3.3.2 Semi-Empirische Methoden

Semi-empirische Methoden beruhen wie auch *ab initio* Rechnungen auf der Wellenfunktion. Jedoch werden aufgrund des noch immer erheblichen Rechenaufwandes zur Lösung der Hartree-Fock Gleichung weitere Vereinfachungen eingeführt. Alle Valenzelektronen werden zusammen mit dem Kern als „effektiver Rumpf“ (effective core) zusammengefasst. Zudem werden alle Zwei-Elektronen-Integrale vernachlässigt oder parametrisiert. Zur Unterscheidung von semi-empirischen Methoden werden die vernachlässigten Integrale betrachtet, sowie die empirisch ermittelten Größen, an welche die verbleibenden Integrale angepasst werden. Es wird dabei zwischen „Complete Neglect of Differential Overlap“ (CNDO), „Intermediate Neglect of Differential Overlap“ (INDO), „Neglect of Diatomic Differential Overlap“ (NDDO) und „Modified Neglect of Differential Overlap“ (MNDO) und dem Fit an Geometrien, Bildungsenthalpien oder Ionisierungspotentialen unterschieden. Die gewählten Parameter sind jeweils elementspezifisch.⁵⁶

1.3.3.3 Dichtefunktionaltheorie

In den bereits beschriebenen Methoden ist die Wellenfunktion die zentrale Größe. Bei der Dichtefunktionaltheorie (DFT) wird sie durch die Elektronendichte (ED, $\rho(r)$) ersetzt. Die ED gibt die Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines Elektrons an einem Punkt im Raum an und ist somit von drei Raumparametern abhängig. Dadurch ist sie einfacher zu handhaben, als die Wellenfunktion, die von Kern- und Elektron-Koordinaten, also Ort und Spin, abhängig ist.

DFT-Rechnungen beruhen auf dem Hohenberg-Kohn Theorem⁷⁰, nach dem die elektronische Energie eines Systems im Grundzustand durch die Elektronendichte beschrieben werden kann. Zudem fanden Hohenberg und

Kohn heraus, dass die ED dem Variations-Theorem unterliegt. Dieses besagt, dass die Energie stets größer oder gleich der exakten Energie eines Systems ist. Wie bereits bei der wellenmechanischen Betrachtung, kann auch die Gesamtenergie eines Systems bei der DFT in einzelne Terme aufgespalten werden:

$$E[\rho(r)] = T_s[\rho(r)] + V_{ne}[\rho(r)] + V_{ee}[\rho(r)] + E_{xc}[\rho(r)] \quad (8)$$

V_{ne} ist die Kern-Elektron Anziehung, V_{ee} die Elektron-Elektron Abstoßung. Durch Kohn und Sham ⁷¹ wurde T_s als die kinetische Energie definiert, wobei davon ausgegangen wird, dass die Energiedichte für nicht korrelierende Elektronen die gleiche wie für „normale“ Elektronen ist. Da Elektronen untereinander wechselwirken, muss ein Korrekturterm für diese Austauschenergie eingeführt werden. Dieser wird als Austausch-Korrelations-Term bezeichnet und wird durch E_{xc} beschrieben. Die kinetische Energie kann nicht exakt bestimmt werden, weshalb in der DFT sogenannte Spinorbitale eingeführt werden, welche nach dem Kohn-Sham Formalismus als Ein-Elektron-Wellenfunktion betrachtet werden. Dadurch kann die Elektronendichte numerisch bestimmt werden. Um den Austausch-Korrelations-Term zu beschreiben, wurden verschiedene Funktionale eingeführt. Funktionale sind dabei mathematisch ausgedrückt Funktionen auf Funktionen. Sie beschreiben also eine Funktion aus einem Vektorraum, dessen Elemente ebenfalls Funktionen sind. Die Funktionale werden in einer Hierarchie mit fünf Stufen organisiert, welche auch als „Jacobs Ladder“ bezeichnet wird. ⁷² Die erste Stufe umfasst die lokale Dichtenäherung (lokal density approximation, LDA). Dieses Funktional beschreibt E_{xc} nur über die Elektronendichte und behandelt dieses als ideales Gas. Bei der Gradientennäherung (generalized gradient approximation, GGA) werden die Dichte und der Gradient der Dichte, also deren erste Ableitung, im Funktional gewertet. Ein Vertreter dieser Funktionalart ist BLYP. Dieses Akronym setzt sich aus dem Austauschfunktional von Becke und dem Korrelationsfunktional von Lee, Yang und Parr zusammen. Die dritte Stufe umfasst die meta-GGA. Diese Näherung ist komplexer als die GGA, und umfasst

die zweite Ableitung der Dichte.⁷³ Die vierte Stufe umfasst die Hybrid-Funktionale, welche auch als hyper-GGA bezeichnet werden. Diese Funktionale zeichnen sich durch die „Beimischung“ von HF-Austauschfunktionalen aus. Der bekannteste Vertreter ist B3LYP und stellt eine aus drei empirischen Parametern gewichtete Mischung aus LDA, BLYP und HF-Austausch dar. Die fünfte Stufe umfasst virtuelle Orbitale, z.B. Beimischung von MP2 Rechnungen zu den DFT-Orbitalen. In dieser Arbeit wird hauptsächlich das B3LYP-Funktional verwendet, da dieses bisher gute Ergebnisse bei kleinen organischen Molekülen liefert. Zudem wurde die von *Grimme et. al.* Entwickelte D3 Korrektur verwendet, um dispersive London oder van-der-Waals-Interaktionen zu berücksichtigen. Diese sind wichtig, um nicht-kovalente Wechselwirkungen wie Wasserstoff-Brücken richtig zu beschreiben. Für diese Korrektur wird ein empirisch bestimmter Koeffizientensatz verwendet.⁷⁴

1.3.3.4 Basissätze

Nach dem Kohn-Sham Formalismus wird die Elektronendichte aus einer Wellenfunktion berechnet, wobei die Gesamt-Wellenfunktion eine Kombination aus Ein-Elektronen-Wellenfunktionen darstellt. Die Form oder Gestalt dieser muss während der Rechnung bestimmt werden. Dabei werden atomzentrierte Funktionen vorgegeben, welche durch Linearkombination Ein-Elektronen-Wellenfunktionen ergeben. Solche Funktionen bilden die Basis für die Ein-Elektronen-Wellenfunktion und werden deshalb als Basissatz bezeichnet. Die mathematische Lösung oder Form für die Basisfunktionen kann der des Wasserstoffs entsprechen und wird Slater-Typ (Slater-Type Orbital, STO) genannt. Alternativ werden einfacher zu integrierende Gauss-Typ-Funktionen (GTF) verwendet. Diese primitiven GTFs haben den Nachteil, dass sie Molekülorbitale in Kernnähe oder großer Entfernung zum Kern nicht gut beschreiben. Durch Kombination mehrerer primitiver GTFs und dadurch eine Näherung an STOs wird dieses Problem umgangen. Diese „kontrahierten“ GTFs

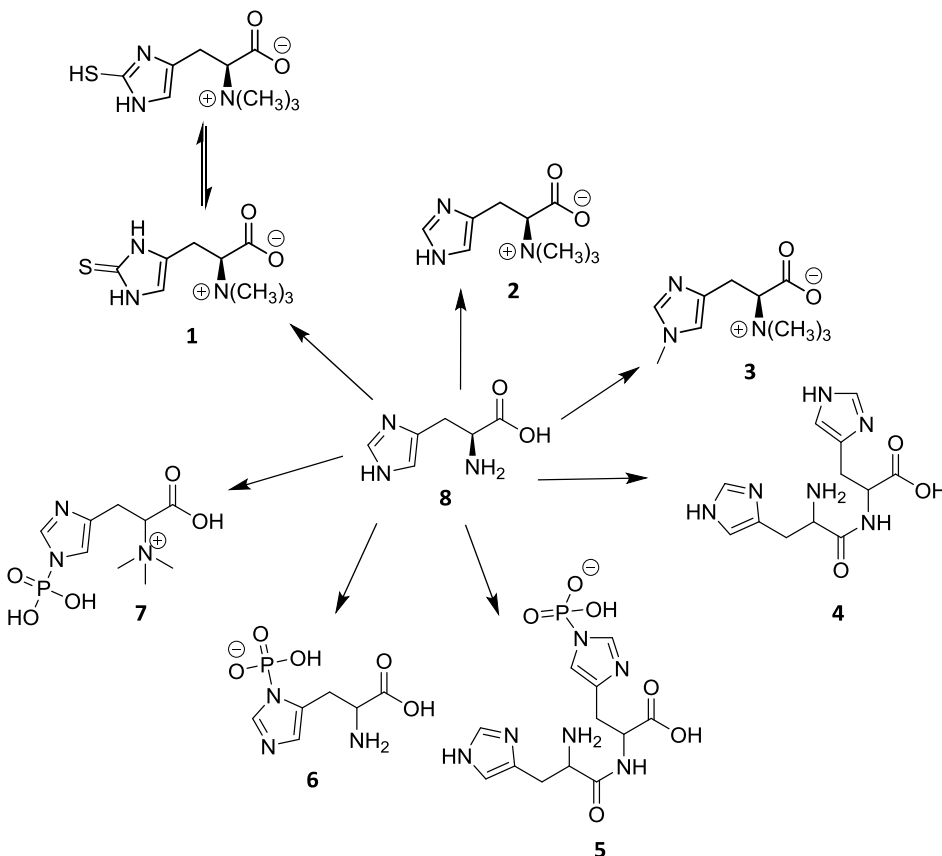
bilden die Grundlage für die quantenchemische Berechnung. Als Beispiel sei hier die Notation der Minimalbasis STO-3G erklärt. Es handelt sich um ein Slater-Typ Orbital, welches durch Linearkombination dreier GTFs beschrieben wird. Bei Wahl der minimalen Basis steht für jedes Atom-Orbital genau eine Funktion zur Verfügung. Um die Ausdehnung eines Atom-Orbitals abhängig von der Bindungssituation besser beschreiben zu können, werden „Mehrfach-Zeta“ Basissätze verwendet. Dabei gibt der Exponent Zeta (ζ) die Ausdehnung der Funktion an. Durch Verwendung eines „double-zeta“ Basissatz wird die Ausdehnung durch Gewichtung zweier Funktionen angepasst. Um den chemisch wichtigen Valenzbereich besser beschreiben zu können, werden sogenannte split-valence Basissätze verwendet. Dabei werden die inneren Orbitale durch kontrahierte GTFs dargestellt und die Valenz-Orbitale werden durch zwei Funktionen beschrieben: einer kontrahierenden GTF und einer primitiven GTF mit unterschiedlichen Orbitalparametern. In der Notation nach Pople setzt sich der Basissatz 6-31G für ein Kohlenstoff-Atom aus zwei kontrahierenden GTFs zusammen. Die 6 vor dem Minus steht für 6 primitive GTFs, welche zusammen eine kontrahierende GTF darstellen, welche den inneren Bereich (core) beschreiben. Der Valenzbereich wird durch die Zahlen 3 und 1 gekennzeichnet. Dabei beschreiben die Zahlen wie viele primitive GTFs jeweils zusammengefasst werden. Der Valenz-Bereich wird dementsprechend durch insgesamt 4 primitive GTFs beschreiben, von denen die ersten drei zusammengefasst werden. Zusätzlich können diffuse und polarisierende Funktionen berücksichtigt werden. Die diffusen Funktionen erlauben es, Moleküle mit einer diffusen Elektronendichte, wie z.B. Anionen oder Moleküle mit vielen freien Elektronenpaaren, besser zu beschreiben. Bei der Polarisation werden Orbitale gezielter ausgerichtet. Dies wird durch die Berücksichtigung von Funktionen mit höherer Nebenquantenzahl erreicht. Einem p-Orbital wird dabei z.B. ein d-Charakter zugemischt.⁵⁶

1.3.3.5 Berücksichtigung von Lösungsmittelleffekten

Die Konformationsanalyse wird meistens in der Gasphase, ohne Lösungsmittelmoleküle durchgeführt. Es ist jedoch schon seit längerem bekannt, dass auch das Lösungsmittel Einfluss auf die Gasphasen-Struktur von Molekülen hat.^{17,28,41,75} Um die energetischen Einflüsse des Lösungsmittels auf die Konformation zu ermitteln, werden so genannte „Self-Consistent-Reaction-Field Methoden“ (SCRF) verwendet. Dabei wird angenommen, dass ein solvatisiertes Molekül sich in einem Hohlraum eines kontinuierlichen Lösungsmittels befindet. Das Lösungsmittel hat in diesem Fall keine molekulare Struktur, sondern wird als einheitliche Wolke mit einer festgelegten Dielektrizitätskonstante behandelt.⁷³ In dieser Arbeit wurde das Polarizable Continuum Model (PCM) verwendet. Durch Betrachtung des Lösungsmittels als Kontinuum anstelle von expliziten Molekülen bleibt der Rechenaufwand praktikabel.

2 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Dissertation sollten die Gasphasenstrukturen von Histidin (**8**) und verwandten Derivaten untersucht werden. Ein wichtiges Thema sollte die Aufklärung der tautomeren Strukturen des Ergothioneins (**1**) sein. Ergothionein ist ein Thiourea Derivat des Histidins, welches einen Schwefel im Imidazol-Ring trägt. Zudem ist der N-Terminus permethyliert, wodurch das Molekül eine permanent positive Ladung trägt. Die Bio-Synthese von Ergothionein geht von Histidin über Hercynin (**2**). Deshalb soll auch Hercynin und sein methyliertes Analogon, *Nε*-Methyl-Hercynin (**3**), synthetisiert und untersucht werden. Ein weiteres Feld soll die Interaktion solcher Derivate mit Metall-Ionen sein. Dabei werden (Erd-)Alkalimetalle (Na, Ca), sowie weiche Nebengruppenmetalle (Ni) untersucht.



Schema 2. Überblick der zu untersuchenden Strukturen. Histidin stellt das zentrale Motiv aller Strukturen dar. Zudem soll die Komplexierung von Metallionen durch diese Strukturen untersucht werden.

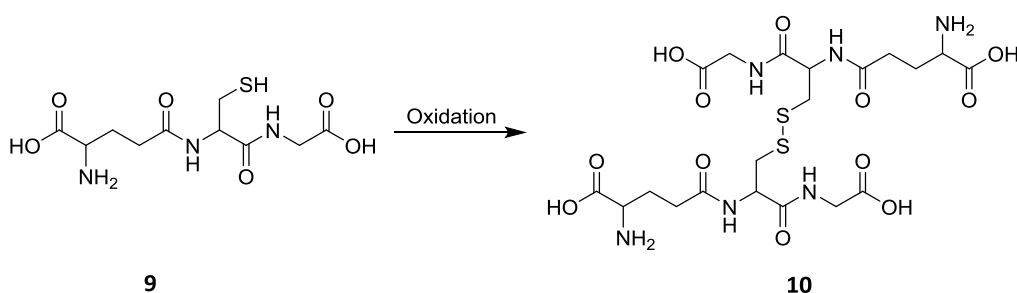
Um das Verhalten kleiner Proteine besser zu verstehen, soll zudem das Dipeptid des Histidins (**8**), als Histidinhistidyl-Ligand für Nickel- und Calcium-Ionen, untersucht werden. Auch die Phosphorylierung als wichtige post-translationale Modifikation soll untersucht werden, da diese Modifikation einen Einfluss auf Konformation und Bindungsaffinität hat.

Die Gasphasenstrukturen aller Zielmoleküle bzw. Analytkomplexe sollen mittels Computerchemie (Kraftfeld und DFT) und massenspektrometrischer Methoden, sowie Gasphasen-Ionen-Spektroskopie untersucht werden. Die dabei erhaltenen Photodissoziations-Spektren werden mit berechneten IR-Spektren verglichen, um so einzelne Konformere zu identifizieren.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Ergothionein und anverwandte Histidin Derivate

Wird Histidin in Cyanobakterien, Mykobakterien oder nicht-Hefe ähnlichen Pilzen zunächst *N*-methyliert, so wird das Trimethylbetain (Hercynin) erhalten. Durch anschließende enzymatische Transformation entsteht Ergothionein (ET).⁷⁶⁻⁸¹ Ergothionein unterliegt einem tautomeren Gleichgewicht zwischen Thiol und Thion am C2 des Imidazol Rings (vgl. Schema 2 und 4). Ergothionein wurde bereits vor einem Jahrhundert im Mutterkornpilz entdeckt.⁸² Seit der ersten Entdeckung wurden nur wenige weitere ET Analoga aus Pilzen oder Pflanzen isoliert.⁸³⁻⁸⁵ Der Mensch, andere Wirbeltiere oder Pflanzen sind nicht in der Lage Ergothionein selber zu synthetisieren, weshalb sie auf eine Aufnahme durch die Nahrung angewiesen sind.^{86,87} Die exakte physiologische Rolle von Ergothionein im Menschen ist noch nicht aufgeklärt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass ET ein wichtiges zelluläres Antioxidant ist. Bestärkt wird diese These dadurch, dass hohe Konzentrationen von ET besonders in menschlichen Blutzellen, Knochenmark oder der Augenlinse vorkommen, welche besonderen Schutz gegen oxidativen Stress benötigen.⁸⁷⁻⁹⁰ In neueren Studien wird die Eigenschaft von ET als potentieller Singulett-Sauerstoff-Quencher untersucht.^{91,92}



Schema 3. Oxidation von Glutathion zum Dimer unter Bildung einer Disulfid-Brücke.

In neutraler Lösung oder in zellulärem Medium bei physiologischem pH liegt das Gleichgewicht zwischen Thiol und Thion deutlich auf Seite des Thions, was

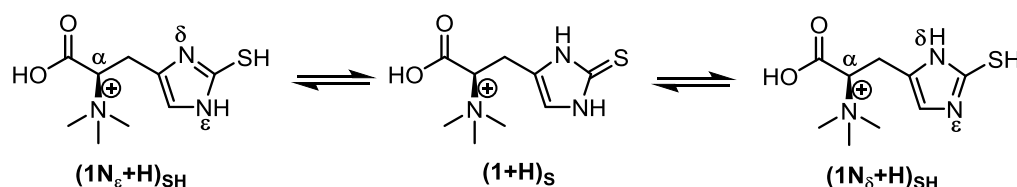
durch Kristallstrukturen belegt wurde.⁹³ Glutathion (**9**), ein wasserlösliches Thiol, hingegen liegt als Thiol vor (vgl. Schema 3).^{81,94}

Im Gegensatz zu Ergothionein bildet Glutathion unter oxidativem Stress leicht Disulfid-Brücken aus.⁹⁵

In diesem Teil sollen die tautomeren Strukturen von ET, also das Gleichgewicht von ET, sowie dessen biologischem Vorläufer Hercynin und dem methylierten Analogon mittels IRMPD untersucht werden. Zudem wurden die einfach geladenen Natrium-Addukte in der Gasphase untersucht, da Natrium-Ionen sowohl extrazellulär als auch intrazellulär mit Konzentrationen von 140 mM bzw. 10-15 mM vorkommen.⁹⁶

3.1.1 IRMPD Spektroskopie und Computerchemische Untersuchungen

Zunächst soll das tautomere Gleichgewicht von ET (Schema 4) in der Gasphase untersucht werden.



Schema 4. Tautomeres Gleichgewicht von protoniertem ET. Das Thion Tautomer $(1+H)_S$ ist die protonierte Form und liegt in der flüssigen Phase unter physiologischem pH hauptsächlich vor.

Für diese Studien wurde ET zunächst mittels ESI in die Gasphase transferiert und entweder in einem FT-ICR oder einer Ionenfalle (QIT) gespeichert.^{97,98} Dort wurden sie IR-Strahlung von einem FEL ($500\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$) oder einem OPO ($3300\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$) ausgesetzt.^{43,99,100} Das dadurch erhaltene Photodissoziations-Spektrum von ET in protonierter Form ist in Abbildung 3 (Seite 27) in schwarz dargestellt. Für die Identifizierung der Gasphasen-Struktur sind als Vergleich fünf berechnete Spektren über das experimentelle Spektrum gelegt. Die computerchemischen Berechnungen wurden von Anthony J.H.M Meijer an der Universität Sheffield durchgeführt. Die berechneten Strukturen zeigen drei

unterschiedliche Thiol-Konformere, sowie zwei Thion-Konformere. Die gefundenen Thiole sind ähnlich stabil, wobei Thiol **b** mit 0 kJ/mol das energetisch günstigste Konformer ist, gefolgt von Thiol **c** mit 3.9 kJ/mol und Thiol **c2** mit 4.8 kJ/mol. Die Thione liegen mit 26.2 kJ/mol (Thion **a**) und 27.3 kJ/mol (Thion **a2**) deutlich höher in der Energie und sind somit in der Gasphase ungünstiger. Die in Abbildung 3 (Seite 27) dargestellten Thiol-Konformere sind in ϵ -Position protoniert. Es wurden auch Rechnungen zu Strukturen, welche in δ -Position protoniert sind, durchgeführt. Die Energien der gefundenen Strukturen liegt jedoch deutlich höher. In Tabelle 1 (Seite 28) sind alle Schwingungsmodi der Konformere und des experimentellen Spektrums gezeigt. Die zur Akquirierung der Gasphasenspektren verwendeten Fragmente können dem experimentellen Teil entnommen werden. Die IR-Spektren der Thione weisen eine starke C=S Streckschwingung bei 1462 cm^{-1} auf. Zudem ist eine Kombinationsschwingung, welche hauptsächlich durch eine sogenannte O-H *in plane* Biege-Schwingung hervorgerufen wird, bei 1140 cm^{-1} zu erkennen. Eine asymmetrische C=O Streckschwingung bei 1767 cm^{-1} dominiert das Spektrum zusätzlich. Die Übereinstimmung der berechneten Spektren und des experimentellen Spektrums ist abgesehen von der größeren Intensität der Absorption der C=S Schwingung überzeugend. Im Vergleich dazu zeigt das Spektrum von Thiol **c** eine bessere Übereinstimmung der Intensitäten. Auch wenn Thiol **c** nicht die Grundstruktur darstellt, scheint es die vorherrschende Struktur in der Gasphase zu sein. Die berechnete Grundstruktur von Thiol **b** weist besonders im Bereich der O-H *in plane* Biege Schwingung (1140 cm^{-1}) keine Absorption auf. Der Grund dafür liegt in der Stabilisierung von Thiol **b** durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Imidazol N_{δ} und dem C-terminalen O-H. Durch diese Stabilisierung ist die O-H *in plane* Biege-Schwingung blauverschoben zu 1480 cm^{-1} .

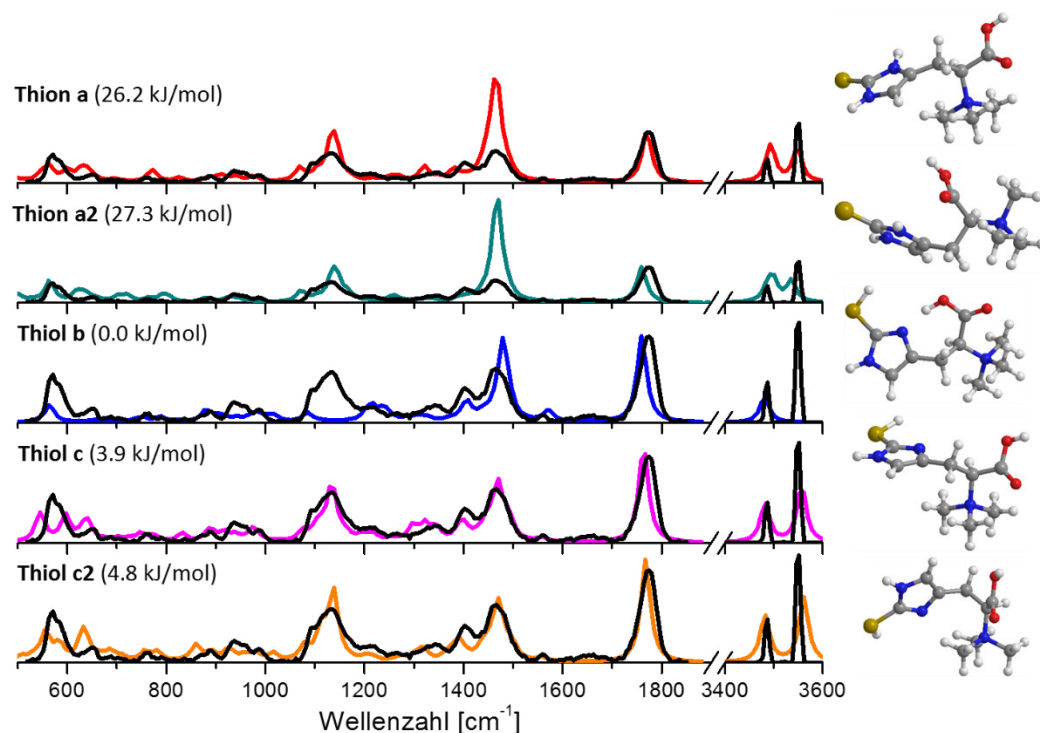


Abbildung 3. Berechnete Spektren der fünf energetisch günstigsten Tautomere von ET (m/z 230) im Vergleich zum experimentellen Spektrum (schwarz). Die berechneten Spektren sind mit einem Faktor von 0.97 ($500\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$) bzw. 0.957 ($3400\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$) skaliert. Alle Intensitäten der gerechneten Spektren wurden auf die C=O Streckschwingung normiert um den Vergleich zu vereinfachen.¹¹

Da die gefundenen Spektren ansonsten konsistent mit dem experimentellen Spektrum sind, wurde zudem der Bereich zwischen $3300\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ untersucht. Dieser Bereich weist im experimentellen Spektrum zwei Banden bei 3490 cm^{-1} und 3550 cm^{-1} auf. Diese Banden können den theoretischen Banden der O-H und N-H Streckschwingungen von Thion **a** und **a2**, sowie Thiol **c** und **c2** zugeordnet werden. Thiol **b** hingegen zeigt nur die N-H Schwingungen, da auch in diesem Fall eine Wasserstoffbrücke die Absorption blauverschiebt. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass Thiol **b**, obwohl es das stabilste Konformer ist, in der Gasphase nicht das dominante Konformer ist. Um diese Vermutung weiter zu untermauern, wurden die relevanten Konformere/Isomere von ET in Methanol untersucht, da Methanol-Lösungen für die ESI-MS Experimente verwendet wurde. Für die Berechnungen wurde dabei das PCM verwendet, um zu untersuchen, ob die in Lösung bevorzugte Ionenstruktur von ET in der Gasphase erhalten bleibt. Eine Retention der

Konformation wurde bereits für deprotonierte bifunktionelle Säuren, wie 4-Hydroxybenzoesäure, 6-Hydroxynikotinsäure oder *trans-para*-Cumarsäure mittels IRMPD-Spektroskopie untersucht und gezeigt.^{28,101,102}

Tabelle 1. Bandenlage des experimentellen und der berechneten Spektren von protoniertem ET. Die berechneten Spektren sind mit einem Faktor von 0.97 (FEL-Bereich) bzw. 0.95 (OPO-Bereich) skaliert. Die Lage der Banden ist in Wellenzahlen angegeben. Erklärung der Symbole: ν -Streckschwingung, δ -Deformationsschwingung „in plane“, γ -Deformationsschwingung „out of plane“, β -Scherschwingung, α -Gerüstschwingung.¹¹

Schwingungs-form	Experiment	Theorie				
		(1+H) _s (a)	(1N _ε +H) _{SH} (b)	(1N _ε +H) _s H(c)	(1N _ε +H) _{SH} (c2)	(1+H) _s (a2)
ν (O-H)	3551	3518		3530	3535	3535
ν (N-H)	3487	3492	3483	3483	3483	3501
ν (C=O)	1775	1767	1759	1767	1767	1759
ν (C=C)	1559		1567	1558	1559	
ν (C=S)	1468	1462/1139				1471
δ (N-H) Imidazol	1468			1471	1468	1471/ 1139
γ (Betain)	1402		1235	1401		1401
δ (C-H)		1382/1322				1261
γ (CH ₂)			1271	1340	1319	
δ (O-H)	1468	1322/1217/ 1139	1479	1322/ 1130	1138	
ν (N-C-N)			1409			
ν (C-N=C-C)				1296		
α	1216			1200		
ν (HC-NH)	1061/1096	1069	1086	1078	1390	1069
ν (CH ₂ -CH)	962	973				
ν (C-N(CH ₃) ₃)	962/837	938/825	877	973/830	860	877
ν (N-CH ₃)		912		921		
δ (S-H)	871			886		
HN-C-NH						938
γ (HO-C=O)	765			772		
γ (C-H) Imidazol		772		746	756	
β (HO-C=O)	648			641		
γ (O-H)	583	598		598	631/687	702
γ (N-H) Imidazol	571	563	563	545	556	562

In einer polaren Methanol-Lösung ist die energetisch günstigste Form das Tautomer Thion **a2**, welches in der Gasphase mit 27.3 kJ/mol im Vergleich zur Grundstruktur von Thiol **b**, das ungünstigste Isomer darstellte. Zudem sind die Thiole **b** und **c** 19.9 bzw. 33.5 kJ/mol und Thion **a** 5.5 kJ/mol ungünstiger als Thion **a2**. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den bisher gefundenen

Kristallstrukturen unter physiologischen Bedingungen von ET.¹⁰³ Um zu verstehen, wie dieser Unterschied zwischen Gas- und Flüssiger-Phase zustande kommt, wurde der mechanistische Verlauf der Isomerisierung von Thion **a2** zu Thiol **b** in der Gasphase theoretisch untersucht.

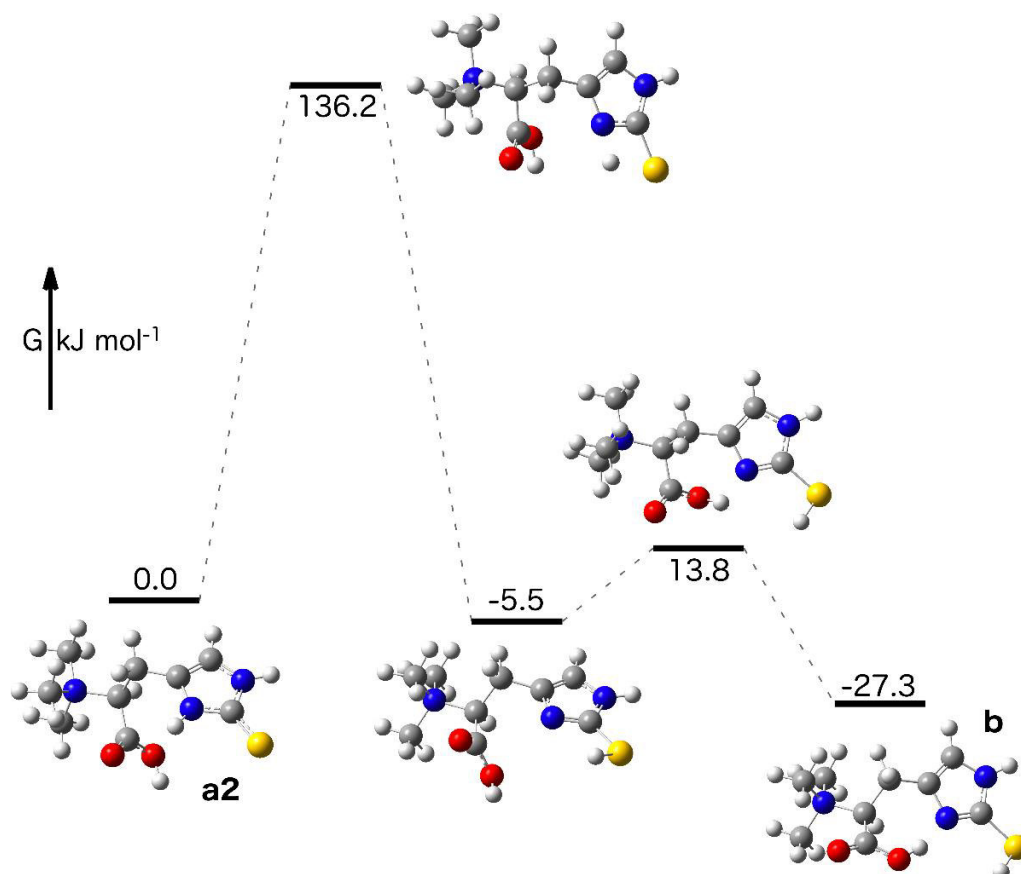


Abbildung 4. Reaktionsprofil der Isomerisierung von Thion **a2** zu Thiol **b** in der Gas-Phase.¹¹

In Abbildung 4 ist zu erkennen, dass die Energiebarriere für die Transformation von Thion **a2** zu Thiol **b** extrem hoch ist. Zunächst muss ein Übergangszustand mit 136.2 kJ/mol erreicht werden. In Methanol ist die Barriere sogar 167.2 kJ/mol hoch. Dieser Prozess ist als solcher exergonisch mit -5.5 kJ/mol und die nachfolgende Isomerisierung des Intermediates zu Thiol **b** muss nur eine vergleichsweise geringe Energiebarriere von 19.3 kJ/mol überwinden. Diese Daten belegen, dass die dominante Form von protoniertem ET in der Gasphase nicht die Thiol-Form, sondern die Thion-Form darstellt. Die IR-Ionen-Spektren und Theorie stehen im Einklang, und deuten darauf hin, dass die

Ionenstruktur, welche in Lösung bevorzugt wird, in die Gasphase transferiert wird und durch eine kinetische Hinderung erhalten bleibt.

In Abbildung 5 und

Abbildung 6 (Seiten 30, 31) sind die experimentellen und berechneten Spektren von Hercynin und *N* ϵ -Methyl-Hercynin gezeigt, mit m/z 198 bzw. 212. Die experimentellen Spektren sind in schwarz dargestellt. Die für die Generierung des Spektrums verwendeten Fragmentationen können dem experimentellen Teil entnommen werden. Für beide Ionen wurden jeweils drei Konformere **a**, **b** und **c** durch computerchemische Analyse bestimmt. Wie auch schon bei dem protonierten ET sind die Gasphasen Grundstrukturen **c** jeweils durch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Imidazol N δ und dem C-terminalen O-H stabilisiert.

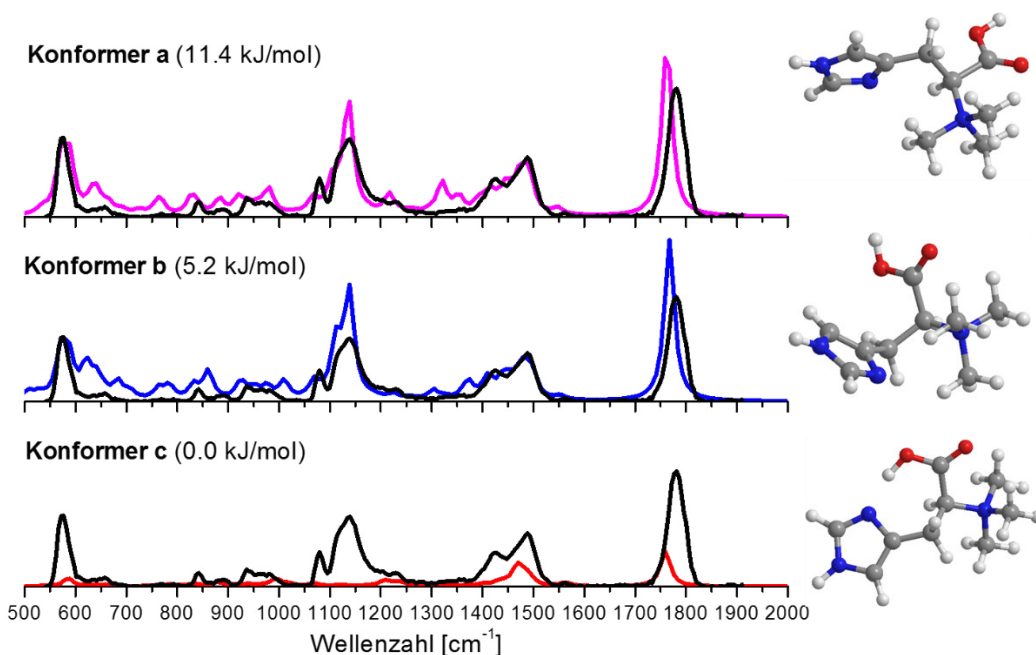


Abbildung 5. Berechnete IR Spektren der drei energetisch günstigsten Konformere des protonierten Hercynins ($2N_{\epsilon}+H$) im Vergleich zu dem IRMPD Spektrum des Molekülions bei m/z 198. Die Bandenlage aller Konformere ist Tabelle 2 zu entnehmen. Die berechneten Spektren sind mit einem Faktor von 0.97

(500-2000 cm^{-1}) skaliert. Alle Intensitäten der gerechneten Spektren wurden auf die C=O Streckschwingung normiert, um den Vergleich zu vereinfachen.¹¹

Auch in diesem Beispiel führt diese Wasserstoffbrücke zu einer Blauverschiebung der O-H *in plane* Biege-Schwingung. Zu erkennen ist dies an der fehlenden Absorption in den berechneten Spektren bei 1140 cm^{-1} . Alle anderen Banden hingegen werden gut repräsentiert. Die Zuordnung aller Banden kann Tabelle 2 (Seite 32) entnommen werden. Durch die bereits erlangten Erkenntnisse aus der ET Studie, wurden auch hier die berechneten Strukturen in Methanol untersucht. Interessanterweise ist die Energieordnung in Methanol genauso wie in der Gasphase. Die relativen Energien ändern sich, jedoch nicht die Reihenfolge der Strukturen. Um diesen scheinbaren Widerspruch zu untersuchen, wurden weitere Rechnungen durchgeführt. Dabei wurde eine partielle Solvat-Hülle um die Ionen simuliert.

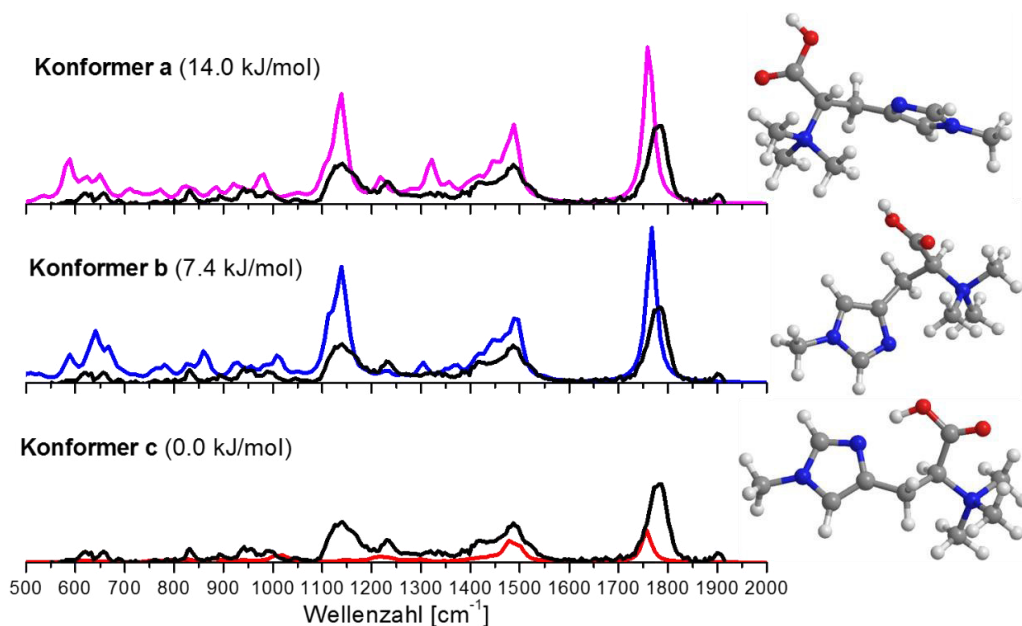


Abbildung 6. Berechnete IR Spektren der drei energetisch günstigsten Konformere des protonierten $N\epsilon$ -Methyl-Hercynins ($3N\epsilon+H$) im Vergleich zu dem IRMPD Spektrum des Molekülions bei m/z 212. Die Bandenlage aller Konformere ist Tabelle 3 zu entnehmen. Die berechneten Spektren sind mit einem Faktor von 0.97 (500-2000 cm^{-1}) skaliert. Alle Intensitäten wurden auf die C=O Streckschwingung normiert um den Vergleich zu vereinfachen.¹¹

Diese lässt im Vergleich zum PCM Wasserstoffbrücken zwischen Ionen und dem Lösungsmittel zu. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Abbildung 7 zu sehen.

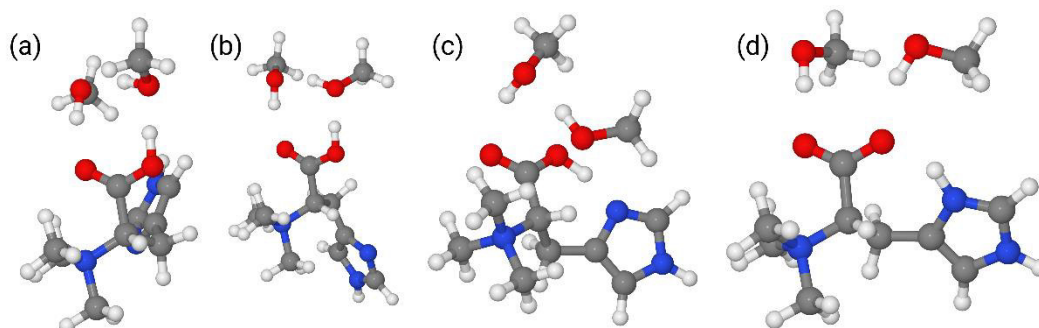


Abbildung 7. Vier simulierte partielle Solvat-Hüllen für die energetisch günstigsten Hercynin-Konformere a-c. Figur (d) ist ein Isomer von (c), bei dem das Proton der Säurefunktion auf den Imidazol Ring übertragen wurde. Die Figuren (a)-(d) sind nach ihrer Energie geordnet, wobei (a) die günstigste Struktur mit 0.0 kJ/mol darstellt, gefolgt von (b) mit 1.7 kJ/mol, (c) mit 10.1 kJ/mol und (d) mit 12.3 kJ/mol. ¹¹

Es ist zu erkennen, dass zwei Methanol-Moleküle über Wasserstoff Brücken mit der Carbonsäure Gruppe interagieren. Die intramolekulare Wasserstoffbrücke in Konformer **c** verhindert eine solche Interaktion, wodurch dieses Konformer bei einer partiellen Solvat-Hülle energetisch am ungünstigsten wird. Durch die strukturelle Ähnlichkeit von Hercynin und *N* ϵ -Methyl-Hercynin wird angenommen, dass der gleiche Effekt auch hier eine Rolle spielt. Die Rechnungen zeigen, dass für Hercynin und *N* ϵ -Methyl-Hercynin in der Gas-Phase nicht die Grundstruktur vorliegt, sondern die energetisch ungünstigeren Konformere **a** und **b**, welche keine intramolekularen Wasserstoffbrücken aufweisen.

Tabelle 2. Bandenlage des experimentellen und der berechneten Spektren des protonierten Hercynins (2*N* ϵ +H). Die berechneten Spektren sind mit einem Faktor von 0.97 skaliert. Die Lage der Banden ist in Wellenzahlen angegeben. Erklärung der Symbole: ν -Streckschwingung, δ -Deformationsschwingung „in plane“, γ -Deformationsschwingung „out of plane“, β -Scherschwingung, α -Gerüstschwingung, τ -Torsionsschwingung. ¹¹

	Experiment	Theorie		
Schwingungsform		(2 <i>N</i> ϵ +H) (a)	(2 <i>N</i> ϵ +H) (b)	(2 <i>N</i> ϵ +H) (c)
$\nu(\text{C=O}) + \delta(\text{O-H})$	1781	1759	1767	1759
$\nu(\text{C=C})$		1549	1549	1558
$\nu(\text{HC=N}) + \beta(\text{CH}_3)$	1488	1479/1444	1479	

$\beta(\text{CH}_2)$			1444	
$\nu(\text{HC-NH})$	1423	1418/1069	1409/1069	
$\delta(\text{HOOC-H})$		1322	1374	
$\delta(\text{O-H})$			1305	1471
$\delta(\text{C-H})$ Imidazol	1229	1217	1226	
$\gamma(\text{CH}_2)$		1348		1287
$\gamma(\text{CH}_3)$		1104		
$\nu(\text{C-OH})$	1139	1139	1139	
$\gamma(\text{Betain})$				1235
$\tau(\text{CH}_3)$			1113	1209
$\nu(\text{C=N=C})$				1069
$\nu(\text{HC-CH}_2)$			1008	
$\delta(\text{CH}_2)$	980	886	973	
$\nu(\text{N-CH}_3)$		921	922	
$\nu(\text{C-N}(\text{CH}_3)_3)$			859	877
$\gamma(\text{C-H})$ Imidazol	842	826	833	833
$\gamma(\text{O-H})$			781	990
$\beta(\text{COOH})$	657	641		659
$\gamma(\text{Imidazol})$	576	580	685	589

Tabelle 3. Lage der Banden des experimentellen Spektrums von *N*-Methyl-Hercynin (3N ϵ +H), sowie der drei energetisch günstigsten Konformere. Die berechneten Wellenzahlen sind mit einem Faktor von 0.97 skaliert. Die Lage der Banden ist in Wellenzahlen angegeben. Erklärung der Symbole: ν -Streckschwingung, δ -Deformationsschwingung „in plane“, γ -Deformationsschwingung „out of plane“, β -Scherschwingung, α -Gerüstschwingung, τ -Torsionsschwingung. ¹¹

Schwingungsform	Experiment	Theorie		
		(3N ϵ +H) (a)	(3N ϵ +H) (b)	(3N ϵ +H) (c)
$\nu(\text{C=O}) + \delta(\text{O-H})$	1782	1759	1767	1758
$\nu(\text{C=C})$	1521		1549	1556
$\nu(\text{N=C}) + \delta(\text{CH}_3)$ Imidazol	1487	1488	1488	1502
$\beta(\text{CH}_3)$		1444		1478
$\nu(\text{HC-COO})$	1418	1418/886		
$\gamma(\text{CH}_2)$		1357		1300
$\gamma(\text{Betain})$		536	1444	1214
$\gamma(\text{CH}_3)$ Imidazol			1418	
$\delta(\text{HOOC-H})$		1322	1374	
$\delta(\text{O-H})$		1278	1305	1020/1005
$\delta(\text{C-H})$ Imidazol	1230	1217		
$\nu(\text{C-OH})$		1139		
$\tau(\text{CH}_3)$ Imidazol +	1046	1051		
$\delta(\text{CH}_2)$		982		
$\nu(\text{C-N}(\text{CH}_3)_3)$		921	1261	881
$\delta((\text{N=})\text{C-H})$	1230		1235	826
$\delta(\text{O-H})$	1141		1139	

$\nu(\text{CH}_2\text{-CH})$			1008	
$\tau(\text{Imidazol})$	991		982	
$\nu(\text{N-CH}_3)$ Betain	952		955	
$\alpha(\text{Betain})$			929	
$\nu(\text{C-N}(\text{CH}_3)_3)$			859	
$\gamma((\text{N=})\text{C-H})$	832		825	
α			781	
$\gamma(\text{C=})\text{C-H})$			763	
$\delta(\text{C=})\text{C-H})$				1145
$\beta(\text{COOH})$	657	650		
$\nu(\text{O-H})$	622	624/589	667/641/589	
$\gamma(\text{Imidazol})$		825/711	628	625

Um den Einfluss eines physiologisch wichtigen Alkalimetalls auf das tautomere Gleichgewicht von ET, sowie die Änderung der Konformation zu untersuchen, wurden von den drei bereits untersuchten Verbindungen ebenfalls die kationischen Natrium Addukte genauer studiert. Die für die Generierung der Spektren verwendeten Fragmentationen können der jeweiligen Sektion im experimentellen Teil entnommen werden.

In Abbildung 8 (Seite 35) ist das experimentelle Spektrum des Natrium Komplexes von ET ($(1\text{N}+\text{Na})_S$ bzw. $(1\text{N}\epsilon+\text{Na})_{SH}$) mit m/z 252 in schwarz dargestellt. Dieses Spektrum wurde in einer späteren Messung aufgenommen, da in der vorherigen Messung aus Zeitgründen nur der Bereich von 1900 bis 1000 cm^{-1} aufgenommen werden konnte. Dieses an einem FT-ICR aufgenommene Spektrum ist in orange dargestellt. Um die Identität der Gasphasen Struktur zu klären, wurden DFT-Rechnungen durchgeführt und die energetisch günstigsten Konformere ebenfalls in Abbildung 8 eingefügt. Die Bandenlage und Zuordnung kann Tabelle 4 (Seite 36) entnommen werden.

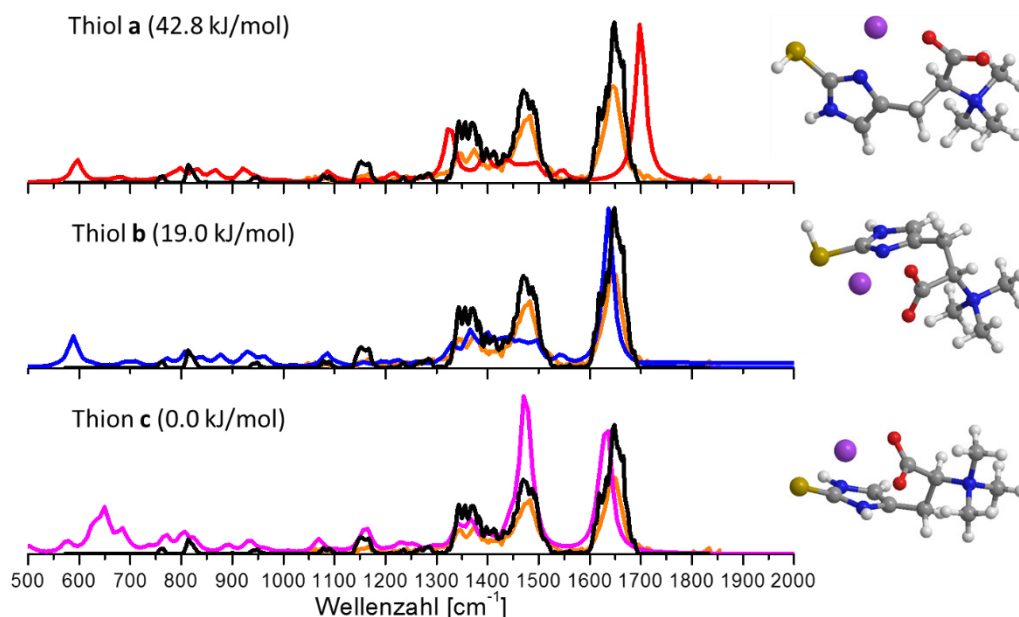


Abbildung 8. Berechnete IR Spektren von drei möglichen Natrium Addukten des ET. Schwarz und orange stellen die experimentellen Spektren des Komplexes bei m/z 252 dar. Das schwarze Spektrum wurde an einer QIT aufgenommen und das orangene im Bereich von 100-1800 cm^{-1} an einem FT-ICR. Die berechneten Spektren sind mit einem Faktor von 0.97 (500-2000 cm^{-1}) skaliert. Alle Intensitäten der gerechneten Spektren wurden auf die C=O Streckschwingung normiert um den Vergleich zu vereinfachen.¹¹

In der obersten Zeile von Abbildung 8 ist das energetisch am wenigsten favorisierte Thiol **a** mit einer Energie von 42.8 kJ/mol dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die C=O Streckschwingung des experimentellen Spektrums bei 1645 cm^{-1} nicht zu der Bandenlage des berechneten Spektrums passt. Zudem fehlt die Absorption bei 1483 cm^{-1} . In der mittleren Zeile der Abbildung ist das gerechnete lineare IR Spektrum eines weiteren Thiol Konformers **b** abgebildet. Thiol **b** ist mit 19 kJ/mol stabiler als Thiol **a**, jedoch nicht die Grundstruktur. Die Lage der Carbonyl-Bande passt für Thiol **b** besser, da hier das Natrium-Ion an beide Sauerstoff-Atome des Carboxylates, sowie einen Imidazol-Stickstoff koordiniert. Für Thiol **a** koordiniert das Natrium-Ion nur an einen der beiden Sauerstoffe. Jedoch ist hier die Absorption bei 1483 cm^{-1} geringer als im experimentellen Spektrum. Thion **c** in der untersten Zeile bildet die experimentellen Spektren hingegen gut ab und ist energetisch das bei weitem günstigste. Die Koordination des Natrium Ions an die beiden Sauerstoffe der

deprotonierten Säure führt zu einer Übereinstimmung in der Bandenlage der C=O Streckschwingung. Eine weitere Bande bei 1480 cm^{-1} kann nur in diesem Tautomer gefunden werden.

Tabelle 4. Bandenlage der experimentellen Spektren des Natrium-Komplexes von ET, sowie der drei energetisch günstigsten Konformere. Die berechneten Wellenzahlen sind mit einem Faktor von 0.97 skaliert. Die Lage der Banden ist in Wellenzahlen angegeben. Erklärung der Symbole: ν -Streckschwingung, δ -Deformationsschwingung „*in plane*“, γ -Deformationsschwingung „*out of plane*“, β -Scherschwingung, α -Gerüstschwingung, τ -Torsionsschwingung. ¹¹

Schwingungsform	Experiment	Experiment	Theorie		
	QIT	FT-ICR	(1N ϵ +Na) _{SH} (a)	(1N ϵ +Na) _{SH} (b)	(1+Na) _S (c)
$\nu(\text{COO})$	1648	1645	1698	1636	1636
$\nu(\text{C=S}) + \delta(\text{N-H})$	1487/1470	1483			1474/1165
$\nu(\text{C=C})$			1549	1540	
$\beta(\text{CH}_3)$			1497	1497	
$\gamma(\text{CH}_3)$	1430		1436		1401
$\delta(\text{N-H})$ Imidazol				1444	
$\nu(\text{N=C=N})$	1374	1373	1392	1401	
$\gamma(\text{CH}_2) + \nu(\text{C-COO})$	1356/1343	1348		1366	1366
$\gamma(\text{CH}_2) + \delta(\text{OOC-C-H})$			1322	1331	
$\tau(\text{CH}_2)$			1217	1270	
$\nu(\text{C-N}(\text{CH}_3)_3)$					1252
$\gamma(\text{Betain})$				1226	1235
$\delta(\text{OOC-C-H})$	1169/1152	1167		1191	1340
$\nu(\text{HC-NH})$	1082		1086	1086	1069
$\nu(\text{C-N}(\text{CH}_3)_3)$	948/813				937/807
$\gamma(\text{C-H})$ Imidazol	765				772

Hier absorbiert die C=S Streckschwingung, welche eine eindeutige Identifikation dieser tautomeren Form zulässt. Um Thiol **b** ausschließen zu können, wurden auch hier die Energien in Methanol berechnet. Es konnte gezeigt werden, dass Thion **c** auch bei Verwendung des PCM Modells die mit Abstand energetisch günstigste Form ist. Tautomer **a** hat eine Energie von 39.7 kJ/mol und **b** eine Energie von 43.1 kJ/mol. Aufgrund dieser Datenlage wird darauf geschlossen, dass der ET-Natrium Komplex wie bereits das protonierte ET als Thion vorliegt.

Zusätzlich zu diesem Datensatz wurden auch die Natrium Komplexe von Hercynin (2N ϵ +Na) und N ϵ -Methyl-Hercynin (3N ϵ +Na) untersucht und mit

berechneten Spektren verglichen. In Abbildung 9 sind die für den Hercynin-Natrium-Komplex als energetisch günstigste Konformere identifizierten Strukturen, sowie deren IR Spektrum gezeigt. In schwarz ist das IRMPD Spektrum von $(2N\epsilon+Na)$ bei m/z 220 gezeigt. Die zur Generierung des Spektrums verwendeten Fragmentationen können dem experimentellen Teil entnommen werden. Ähnlich zu Thiol **a** $(1N\epsilon+Na)_{SH}$, ist die C=O Streckschwingung des energetisch ungünstigsten Konformers **a** (16.2 kJ/mol) blauverschoben.

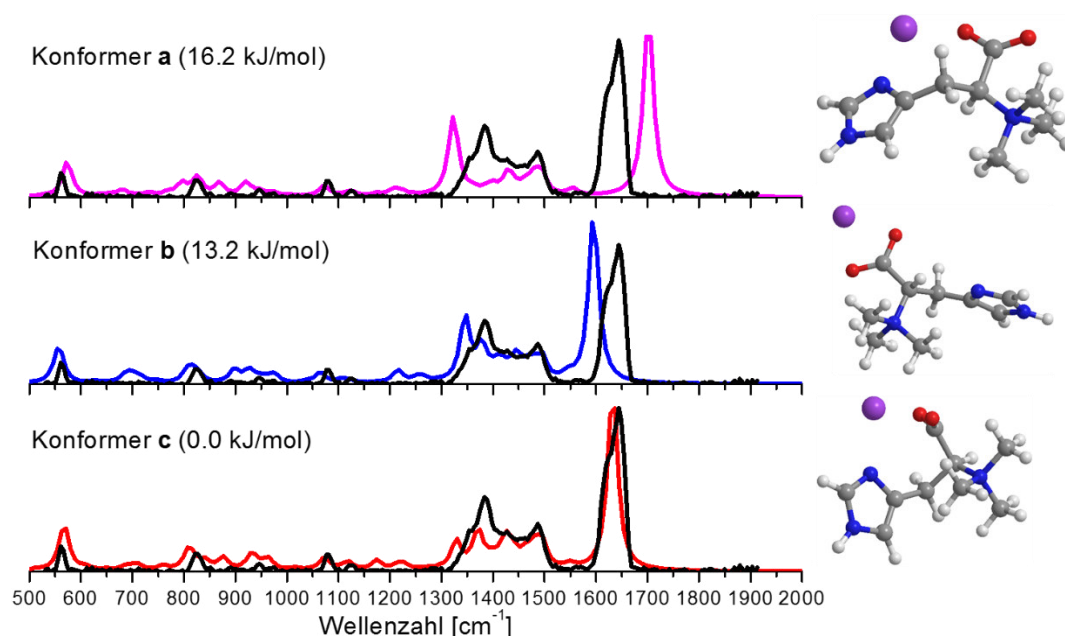


Abbildung 9. Berechnete IR Spektren von drei möglichen Natrium Addukten des Hercynins mit m/z 220. Schwarz stellt das experimentelle Spektrum dar. Die berechneten Spektren sind mit einem Faktor von 0.97 (500-2000 cm^{-1}) skaliert. Alle Intensitäten der gerechneten Spektren wurden auf die C=O Streckschwingung normiert, um den Vergleich zu vereinfachen.¹¹

Das Natrium-Ion wird hier ebenfalls nur durch einen Sauerstoff und einen Imidazol-Stickstoff komplexiert. Dadurch kommt es zu einer Stärkung der Doppelbindung des ungebundenen Sauerstoffs, was zur Folge hat, dass die Carbonyl-Bande blauverschoben ist. Auch Konformer **b** mit einer Energie von 13.2 kJ/mol weist eine Verschiebung der C=O Streckschwingung im Vergleich zum experimentellen Spektrum auf. Das Natrium-Ion ist bei Konformer **b** durch

beide Sauerstoffe der Säurefunktion komplexiert. Dadurch werden die C=O Bindungen geschwächt und es kommt zu einer Rotverschiebung. Die Grundstruktur von Konformer **c** (0.0 kJ/mol) hingegen bietet drei Komplexierungsstellen (beide Sauerstoffe, sowie N_δ des Imidazol-Rings). Dadurch stimmen die Bandenlage von Experiment und Rechnung überein. Diese Verschiebungen der Frequenzen wurden bereits von *Armentrout* für protoniertes Histidin festgestellt. Je nachdem, ob eine Wasserstoffbrücke zwischen dem OH und dem N_δ des Imidazol-Ringes vorhanden ist, ist die Carbonyl-Bande rot- oder blauverschoben.¹⁰⁴ Zudem stellte er fest, dass die Lage der Carbonyl-Bande in Histidin-Alkalimetall-Komplexen mit zunehmendem Ionenradius des Metalls blauverschoben wird.¹⁰⁵

Tabelle 5 können die genauen Bandenlagen und deren Zuordnung entnommen werden.

Tabelle 5. Bandenlage der experimentellen Spektren des Natrium Komplexes von (2Nε+Na), sowie der drei energetisch günstigsten Konformere. Die berechneten Wellenzahlen sind mit einem Faktor von 0.97 skaliert. Die Lage der Banden ist in Wellenzahlen angegeben. Erklärung der Symbole: ν-Streckschwingung, δ-Deformationsschwingung „in plane“, γ-Deformationsschwingung „out of plane“, β-Scherschwingung, τ-Torsionsschwingung.¹¹

Schwingungsform	Experiment	Theorie		
		(2Nε+Na) (a)	(2Nε+Na) (b)	(2Nε+Na) (c)
ν(COO)	1644	1698	1593	1636
ν(C=C)	1570	1558	1545	1549
β(CH ₃)	1487/1428	1488/1427	1497	1488
τ(CH ₃)			1479/1444/1113	
γ(CH ₃)		1401	1409	
β(CH ₂)				1427
ν(HC-COO)	1383	1322	1374	1374
γ(OOCC-H)+ γ(CH ₂)			1348	
τ(CH ₂)		1174/676	1261	
γ(CH ₂)				1331
δ(H-C) Imidazol + τ(CH ₃)			1217	1226
ν(OOC-CH)+ τ(CH ₂)				1174
ν(HC-NH)			1069	1519/1078
ν(HC=NH)	1126/1081	1121/1069		
ν(C=N-C)	972	973		
ν(C-N(CH ₃) ₃)		868		
δ(CH ₂)	972	825	973/903	964/877
ν(N-CH ₃)		921	929	929/711
δ(CH ₂) + ν(C-COO)				842
γ((N=)C-H)+				807

$\beta(\text{COO})$		798		
$\nu(\text{C=C-H})$	822	737	816	763
$\tau(\text{Imidazol})$			632	685
$\nu(\text{HC-CH}_2)$				606
$\nu(\text{Imidazol})$	561	571	554	571

Für den Natrium Komplex von *N* ϵ -Methyl-Hercynin ($3\text{N}\epsilon+\text{Na}$) wurde ein IRMPD Spektrum mit m/z 234 aufgenommen und mit den drei als energetisch günstigsten Konformeren **a**, **b** und **c** verglichen. Die Konformere **a** und **b** sind ähnlich stabil mit relativen Energien von 15.3 bzw. 15.1 kJ/mol. Konformer **c** stellt die Grundstruktur (0.0 kJ/mol) dar. Die Spektren sind in Abbildung 10 gezeigt.

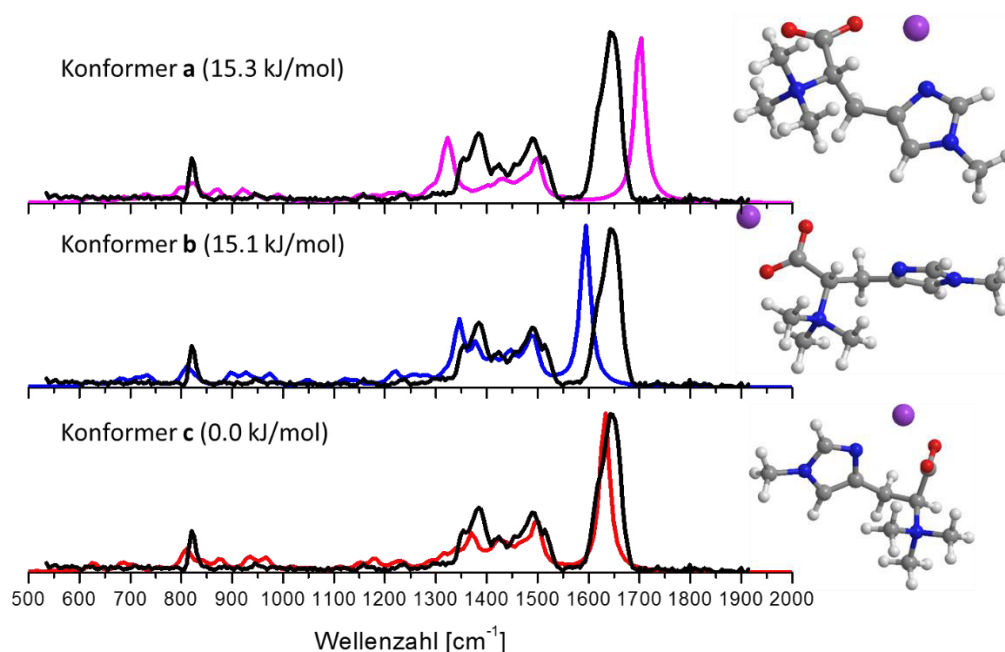


Abbildung 10. Berechnete IR Spektren von drei möglichen Natrium Addukten von ($3\text{N}\epsilon+\text{Na}$) mit m/z 232. Schwarz stellt das experimentelle Spektrum dar. Die berechneten Spektren sind mit einem Faktor von 0.97 ($500\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$) skaliert. Alle Intensitäten der gerechneten Spektren wurden auf die C=O Streckschwingung normiert um den Vergleich zu vereinfachen.¹¹

Die Konformere von ($3\text{N}\epsilon+\text{Na}$) sind in Bezug auf ihre Komplexierung analog zu denen von ($2\text{N}\epsilon+\text{Na}$). Konformer **a** zeigt dadurch die gleiche Blauverschiebung der Carbonyl-Bande und Konformer **b** eine Rotverschiebung eben dieser. Die Bandenlage von Konformer **c** und dem experimentellen Spektrum hingegen

stimmen erneut überein. Eine Übersicht aller Bandenlagen und eine Zuordnung der zugehörigen Schwingung kann Tabelle 6 (Seite 40) entnommen werden.

Tabelle 6. Bandenlage der experimentellen Spektren des Natrium Komplexes von Ne-Methyl-Hercynin, sowie der drei energetisch günstigsten Konformere. Die berechneten Wellenzahlen sind mit einem Faktor von 0.97 skaliert. Die Lage der Banden ist in Wellenzahlen angegeben. Erklärung der Symbole: ν -Streckschwingung, δ -Deformationsschwingung „in plane“, γ -Deformationsschwingung „out of plane“, β -Scherschwingung, α -Gerüstschwingung, τ -Torsionsschwingung. ¹¹

Schwingungsform	Experiment	Theory		
		(3Ne+Na) (a)	(3Ne+Na) (b)	(3Ne+Na) (c)
$\nu(\text{COO})$	1642	1703	1595	1633
$\nu(\text{HC=N}) + \gamma(\text{CH}_3)$ Imidazol	1514/1489	1502	1486/1408	1494
$\gamma(\text{CH}_3)$ Betain		1432/1401		
$\beta(\text{CH}_2)$ Scissoring	1424			1424
$\delta(\text{CH}) + \beta(\text{OOC-C-H})$	1384/1354	1323	1377	
$\delta(\text{OOC-C-H})$		1207		
$\nu(\text{HC-COO})$				1370
$\nu(\text{H}_3\text{CN-CH})$				1339
$\gamma(\text{CH}_2) + \delta(\text{OOC-C-H})$				1315
$\tau(\text{CH}_2)$			1253	1292
$\delta(\text{C-H})$ Imidazol	1239		1346	1230
$\tau(\text{CH}_2) + \delta(\text{OOC-C-H})$	1173			1176
$\nu(\text{(C=N)-N-C(=N)})$	979	989	1284	
$\delta(\text{(C=C)-C-H})$	1158	1152	1145	1152
$\delta(\text{H})$ Imidazol			1222	
$\tau(\text{CH}_3)$ Betain		803	1447/1121	1114
$\tau(\text{CH}_3)$ Imidazol			1051	178
$\nu(\text{CH}_2\text{-CH})$				1020
$\nu(\text{N-CH}_3)$ Betain		920		
$\nu(\text{Imidazol})$				966
α	944			935
$\delta(\text{CH}_2)$		1176	896	873
$\delta(\text{CH}_2) + \nu(\text{HC-COO})$				842
$\delta(\text{CH}_2) + \gamma(\text{H})$ Imidazol		826		
$\nu(\text{C-N(CH}_3)_3)$	875/820	873		811
$\nu(\text{H}_2\text{C-C})$ Imidazol			733	
$\gamma(\text{(C=C)-C-H})$		764	710	757
$\gamma(\text{(C=C)-C-H}) +$		733	811	710
$\gamma(\text{COO})$			679	
$\tau(\text{Imidazol})$		987		687
$\gamma(\text{Imidazol})$		625		625

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das tautomere Gleichgewicht von Ergothionein sowie zwei weiteren Histidin Derivaten mittels IRMPD

Spektroskopie und DFT Rechnungen untersucht werden konnte. Es wurde festgestellt, dass weder ET, noch Hercynin, noch Nε-Methyl-Hercynin in der Gasphase in der Grundstruktur, also der Struktur mit der geringsten Energie, gefunden werden konnten. Durch Untersuchung der einzelnen Strukturen, sowie des Isomerisierungspfades von ET wurde gezeigt, dass diese Moleküle die in Lösung günstigste Struktur in der Gasphase beibehalten. Solche „Carry Over“ Phänomene sind nicht unbekannt. Die Gruppe um Gert von Helden untersuchte bereits 2016, unter welchen Bedingungen es möglich wird, die Konformation von Proteinen aus der Lösung in die Gasphase zu übertragen. Sie konnten zeigen, dass für β -Lactoglobulin und Myoglobin die Sekundär- und Tertiärstrukturen bei sanftem Transport in die Gasphase erhalten bleiben.¹⁴ Ein Jahr zuvor zeigt die gleiche Gruppe am Beispiel von Benzocain, dass das beim ESI Prozess verwendete Lösungsmittel Einfluss auf die Protonierungsstelle und somit die Gasphasenstruktur hat. Sie zeigten, dass im Fall von Benzocain bei Verwendung von aprotischen Lösungsmittel die energetisch günstigste Struktur in Lösung kinetisch „gefangen“ wird und so ohne Veränderung in die Gasphase transferiert wird.¹⁰⁶

Für die Natrium-Komplexe dieser Moleküle konnte gezeigt werden, dass diese in der Gasphase die berechnete Grundstruktur annehmen. Besonders interessant ist dies für ET+Na, dessen Grundstruktur eindeutig als Thion identifiziert werden konnte. Diese Ergebnisse können helfen die Anti-Oxidativen Eigenschaften von ET unter physiologischen Bedingungen zu verstehen. Wenn ET bei Anwesenheit von Natrium-Kationen als Thion und nicht als Thiol vorliegt, kann es keine Disulfid-Brücken ausbilden. Weitere Experimente mit Kalium wären an dieser Stelle sinnvoll, da die Konzentration von K^+ intrazellulär bei 140 mM liegt und damit ca. 10-mal höher als die Konzentration von Na^+ .¹⁰⁷ Interessant ist hier nicht nur die unterschiedliche Konzentration, sondern auch der vergrößerte Ionenradius des Kaliums. *Dunbar* zeigte 2009, dass sich, bei zunehmendem Ionenradius von Erdalkalimetallen, die bevorzugte Konformation von Histidin von einer „Charge Solvation“ Struktur zu

einer Salzbrücke ändert.¹⁰⁸ Das durch oxidativen Stress von Histidin entstehende Oxo-Histidin wäre ein weiteres interessantes Molekül um die Effekte der Chalkogene zu untersuchen. Leider konnte während dieser Arbeit kein synthetischer Zugang zu diesem Analyten gefunden werden.

3.2 Histidin-Metall Komplexe

Histidin (His) ist durch seine Imidazol-Seitenkette amphoter. D.h. bei neutralem pH-Wert kann es sowohl als Base als auch als Säure fungieren.¹⁰⁹ Dieses Verhalten wird bei der Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (immobilizes metall ion affinity chromatography, IMAC) ausgenutzt.

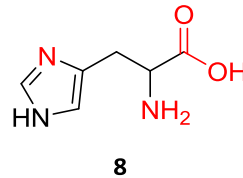


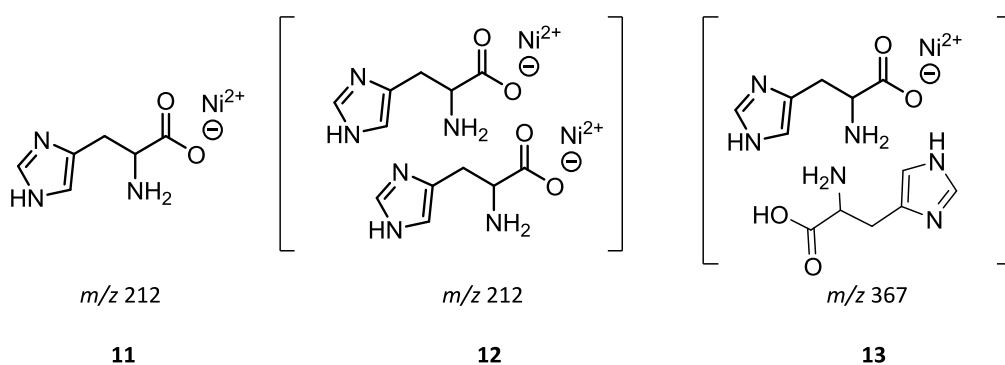
Abbildung 11. Histidin mit seinen drei potenziellen Bindungsstellen für Kationen. Die Bindungsstellen sind in Rot dargestellt.

Durch seine Struktur bietet Histidin drei potenzielle Bindungsstellen für Metall- oder Übergangsmetall-Kationen an (vgl. Abbildung 11): Die Carboxyl-Gruppe, den Imidazol Stickstoff sowie der Amino-Gruppen Stickstoff. Bei der IMAC werden nun Nickel Kationen in eine Matrix eingebracht und das zu reinigende Protein wird mit einem His-tag versehen. Also mit einem Rest, welcher in der Regel 6 konsekutive Histidin-Reste trägt. Passiert ein Protein die Nickel-Kationen so wird es über den His-tag „festgehalten“, während die nicht erwünschten Verunreinigungen die Matrix ohne Interaktionen passieren. Um die His-tags wieder vom Nickel zu lösen, wird mit einer leicht sauren Lösung eluiert, wodurch die Imidazol-Ringe protoniert werden und so ihre Affinität zum Kation verlieren.^{1,4,110} Proteine mit aufeinanderfolgenden Histidin Resten können in der Natur häufig in intrinsisch ungeordneten Proteinen^{2,3}, Schlangengift, oder der Interchromatin-Granula gefunden werden.¹ Die Funktion dieser Histidin-reichen Domänen ist bisher nicht bekannt. Es ist jedoch bekannt, dass sie Bindungsstellen für Übergangsmetalle, wie Cu^{2+} oder Ni^{2+} , darstellen und somit für den Metall Ionen Transport in der Zelle zuständig sind.^{1,4} Die genaue Koordination von solchen Übergangsmetallen zu Histidin-reichen Domänen ist aber ebenfalls noch nicht aufgeklärt. Um diese Koordinationsmotive zu untersuchen, werden vereinfachte kationische

Komplexe von Histidin mit Nickel und Calcium in der Gasphase untersucht. Nickel und Calcium unterscheiden sich deutlich in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften. Nickel ist ein typisches spätes Übergangsmetall mit einem kleinen Ionenradius von 0.69 Å. Nickel zeigt eine hohe Affinität zu Lewis-basischen Atomen in Liganden, wie z.B. Stickstoff.¹¹¹⁻¹¹³ Zudem können Nickel-Komplexe durch die d-Orbitale des Nickels verschiedene Geometrien einnehmen. Je nach Ligandenfeldaufspaltung sind diese oktaedrisch, tetraedrisch oder quadratisch planar. Calcium als Erdalkalimetall weist einen größeren Ionenradius auf (0.99 Å) und ist leichter polarisierbar. Dadurch ist die Bindungsaffinität zu Peptid-Liganden geringer.

3.2.1 $[\text{Ni}^{2+}(\text{His-H})]^+$

Zunächst sollte der Komplex von einem einzelnen deprotonierten His mit Nickel in der Oxidationsstufe +II mittel ESI-MS untersucht werden. Dazu wurde eine Lösung aus NiCl_2 und Histidin hergestellt und entsprechend verdünnt. Es wurde erwartet den Komplex mit einem m/z 212 zu detektieren. Dies war jedoch nicht der Fall.



Schema 5. Komplex **11** sollte untersucht werden, wurde jedoch nicht detektiert. Stattdessen wurden die Komplexe **12** und **13** gefunden.

Es wurde ein zweifach geladener Komplex mit ebenfalls m/z 212, sowie ein weiterer Komplex mit m/z 367 detektiert. Dieser wurde als $[\text{Ni}^{2+}(\text{His})(\text{His-H})]^+$ identifiziert. In Schema 5 sind die Komplexe mit zugehörigem m/z abgebildet.

Durch Verwendung von Nickelacetat und Pyridin als Base sollte eine Deprotonierung des Histidins erfolgen und somit auch $[\text{Ni}^{2+}(\text{His-H})]^+$ zugänglich sein.¹¹⁴ Doch auch in diesem Fall konnte nur Komplex **13** mit m/z 367 gefunden werden. Es wurde versucht durch Aktivierung der Komplexe mit CID diese so zu fragmentieren, dass ein intaktes Histidin-Molekül auf der einen und der Histidyl-Nickel-Komplex auf der anderen Seite entstehen. Dies gelang jedoch nicht, da bei diesen Versuchen die Histidin-Reste fragmentierten, ohne sich jedoch vom Nickel-Kation zu lösen. Diese Phänomene wurden bereits von *Armentrout et al.* beobachtet.^{105,115} Die Gruppe untersuchte unter anderem Histidin Komplexe mit Cadmium und Zink. Auch sie erhielten nur $[\text{M}^{2+}(\text{His})(\text{His-H})]^+$ mit $\text{M} = \text{Cd}, \text{Zn}$. Jedoch waren sie in der Lage durch Verwendung eines cw- CO_2 Lasers für die Fragmentierung auch die $[\text{M}^{2+}(\text{His-H})]^+$ Komplexe zu generieren.

3.2.2 $[\text{M}^{2+}(\text{His})(\text{His-H})]^+$

Da die monomeren Komplexe von Histidin mit Nickel nicht untersucht werden konnten, wurden die entsprechenden Komplexe mit zwei Histidin-Liganden untersucht, wobei jeweils ein Ligand deprotoniert vorlag, untersucht. Dabei sollten sowohl Nickel Komplexe, als auch Komplexe mit Calcium untersucht werden. Die Gruppe um *Dunbar* untersuchte ebenfalls die Bindungsmotive von solchen Aminosäure-Komplexen mit Metallen mittels IRMPD. Sie untersuchten die Interaktion von Phenylalanin, einer, wie auch Histidin, aromatischen Aminosäure, mit Zink $[\text{Zn}^{2+}(\text{Phe})(\text{Phe-H})]^+$.⁹⁹ Während der Untersuchung stellte die Gruppe fest, dass durch die beiden nicht miteinander verbundenen Liganden eine extrem große strukturelle Vielfalt vorhanden ist, wodurch Sie sich bei der computerchemischen Analyse auf bereits bekannte Struktur motive beschränkten.

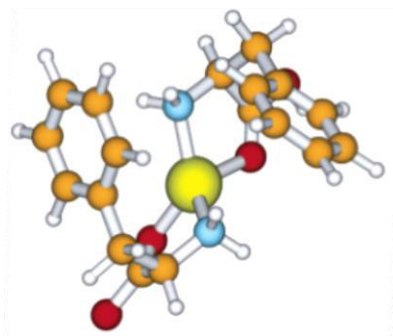


Abbildung 12. Die energetisch günstigste Struktur der $[\text{Zn}^{2+}(\text{Phe})(\text{Phe-H})]^+$ Komplexe. Diese liefert auch die beste Übereinstimmung zwischen theoretischem und experimentellem Gasphase-IR-Spektrum. Aus ⁹⁹.

Die beste Übereinstimmung zwischen theoretischem und experimentellem IR-Spektrum lieferte dabei eine Koordination der Liganden über die π -Elektronen der Aromaten, sowie der Amino-Stickstoffe und jeweils einem Sauerstoff des C-Terminus. Die Struktur ist in Abbildung 12 gezeigt.

3.2.2.1 IRMPD Spektroskopie und Computerchemische Untersuchungen

Für die untersuchten Komplexe wurden Photodissoziations-Spektren im Bereich von $500 - 1900 \text{ cm}^{-1}$ aufgenommen. Die für die Photodissoziations-Spektren verwendeten Fragmentationen können dem entsprechenden Unterkapitel im experimentellen Teil entnommen werden. Für eine Identifizierung der Konformere wurden lineare IR Spektren berechnet. Abbildung 14 zeigt das experimentelle Spektrum von $[\text{Ni}^{2+}(\text{His})(\text{His-H})]^+$ mit m/z 367. Mittels DFT-Rechnungen wurden drei ähnlich stabile Konformere **a**, **b** und **c** identifiziert. Das Nickel(II) Kation mit einer Elektronenkonfiguration von $[\text{Ar}]3d^8$ kann verschiedene Koordinations-Motive annehmen. Typisch sind quadratische, diamagnetische low spin Komplexe, bei denen die vorhandenen Elektronen alle gepaart vorliegen, oder paramagnetische, oktaedrische Komplexe, bei denen die zwei Elektronen ungepaart vorliegen. Ob ein Komplex oktaedrisch oder quadratisch ist, hängt von den Liganden ab und lässt sich oft schon anhand der Farbe abschätzen. Quadratische Komplexe sind meist Gelb oder Rot und

oktaedrische Komplexe Grün bis Violett.¹¹⁶ Die Lösung des hier untersuchten Komplexes zeigte eine starke violette Färbung. Dies und die Kristallstruktur des bis(histidino)Nickel-Komplexes, welche eine oktaedrische Struktur zeigt¹¹⁷, gaben Anlass dazu, Nickel bei den Berechnungen als Triplett zu betrachten. Die berechneten Spektren sind ebenfalls in Abbildung 14 (Seite 48) dargestellt. In den drei berechneten Strukturen ist das Nickel-Ion jeweils sechsfach koordiniert. Die Konformere **b** und **c** lassen dabei eine verzerrte Oktaeder-Geometrie erkennen. In Abbildung 13 ist diese durch die grünen Markierungen in Konformer **c** hervorgehoben. Um eine bessere Übersicht zu erhalten, wurden hier die Wasserstoffe ausgeblendet.

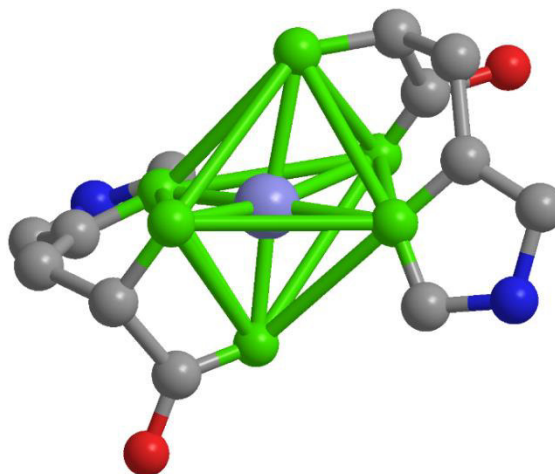


Abbildung 13. Konformer **c** von $[\text{Ni}^{2+}(\text{His})(\text{His-H})]^+$. In Grün ist die Oktaeder Struktur dargestellt. Der Übersicht halber wurden die Wasserstoffe ausgeblendet. In der Mitte ist Nickel als zentrales Atom zu erkennen.

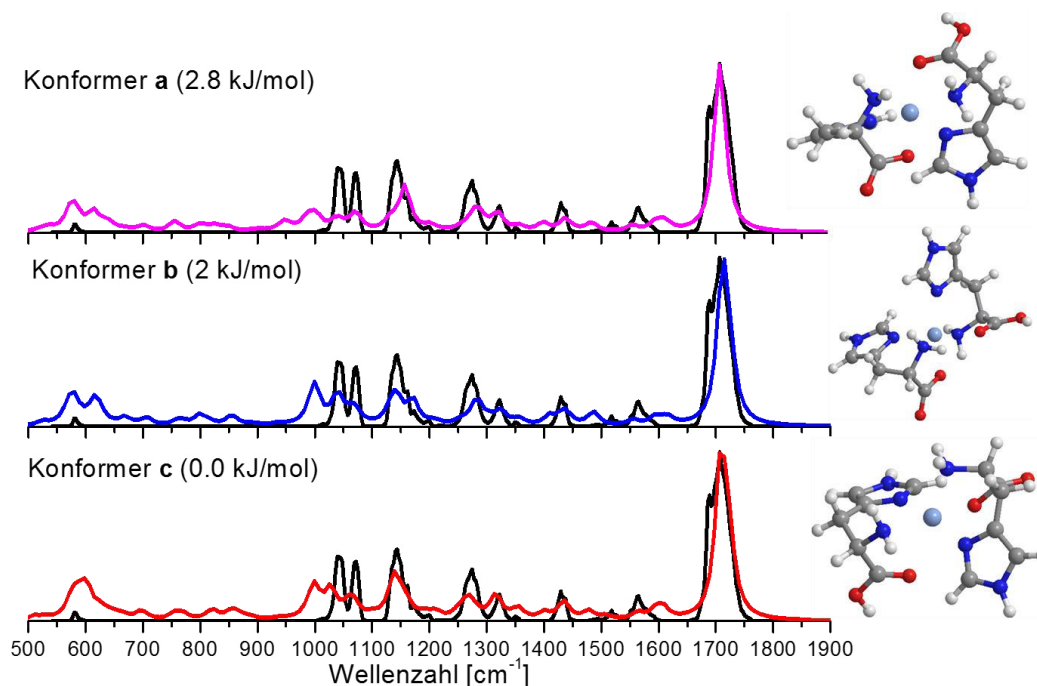


Abbildung 14. Berechnete lineare IR-Spektren möglicher Konformer **a**, **b** und **c** des $[\text{Ni}^{2+}(\text{His})(\text{His-H})]^+$ Komplexes bei m/z 367. Das in schwarz dargestellte Spektrum wurde experimentell bestimmt. Die Absorptionsintensität der gerechneten Spektren wurde auf die C=O Bande normiert, um den Vergleich zu vereinfachen. Die Wellenzahlen sind mit einem Faktor von 0.97 skaliert.

Die charakteristische C=O Streckschwingung liegt für die Konformere **a** und **c**, sowie in dem experimentellen Spektrum bei 1706 cm^{-1} und rührt von dem deprotonierten C-Terminus her. Diese Schwingung ist bei Konformer **b** leicht verschoben zu 1715 cm^{-1} . Hier sind jedoch beide C=O Banden resonant. Die Übereinstimmung der berechneten und des experimentellen Spektrums sind überzeugend. Die drei berechneten Strukturen unterscheiden sich in ihren Spektren und der Energie kaum, sodass nicht eindeutig bestimmt werden kann, welches Konformer hauptsächlich vorliegt. Es ist wahrscheinlich, dass alle drei Formen parallel vorliegen. Die genauen Bandenlagen und Vibrationsmodi können Tabelle 7 (Seite 49) entnommen werden.

Tabelle 7. Bandenlage des experimentellen Spektrums von $[\text{Ni}^{2+}(\text{His})(\text{His-H})]^+$, sowie der drei energetisch günstigsten Konformere. Die berechneten Wellenzahlen sind mit einem Faktor von 0.97 skaliert. Die Lage der Banden ist in Wellenzahlen angegeben. Erklärung der Symbole: ν -Stretschwingung, δ -Deformationsschwingung „in plane“, γ -Deformationsschwingung „out of plane“, β -Scherschwingung, α -Gerüstschwingung, τ -Torsionsschwingung.

Schwingungsform	Experiment	Theorie		
		Konformer a	Konformer b	Konformer c
$\nu(\text{C=O})$ His-H	1706/1689	1706	1715	1706
$\nu(\text{C=O})$	1706/1689		1715	
$\beta(\text{NH}_2)$ His-H		1602		1602
$\beta(\text{NH}_2)$ His		1602	1611	
$\beta(\text{CH}_2)$ His-H		1437		
$\nu(\text{HC=C})$	1562		1558	1567
$\nu(\text{HC=N})$	1562	1558/1480	1488	1479
	1518			
	1429			
$\nu(\text{HC=N})$ His	1072	1069	1436	
$\delta(\text{N-H})$ His				1436
$\gamma(\text{COOH})\text{C-H}$			1410	1401
$\tau(\text{CH}_2)$ His-H				1357
	1349			
$\delta(\text{COO})\text{C-H}$	1322	1287	1323	
$\delta(\text{COOH})\text{C-H}$		1401		
$\gamma(\text{COO})\text{C-H}$	1322	1322	1288	1314
Ringkontraktion	1275			1270
$\delta(\text{O-H})$		1157	1174/1139	
$\tau(\text{NH}_2)$	1144			1139
$\tau(\text{CH}_2)$ His		1200		1061
$\gamma(\text{NH}_2)$ His-H	1042		1043	1026
$\nu(\text{NH}_2\text{-CH})$	1042	1043		
$\gamma(\text{NH}_2)$ His		947/999	1174/999	999
$\alpha(\text{His})$		703		703
α			668/851	860/825/694
$\gamma(\text{C=C})\text{C-H}$			799/764	764
$\gamma(\text{O-H})$		615	615	598
$\tau(\text{Imidazol})$ His		755/842	580	598
$\tau(\text{Imidazol})$ His-H	580	580/807		

Der analoge Komplex mit Calcium ($[\text{Ca}^{2+}(\text{His})(\text{His-H})]^+$, m/z 349) wurde ebenfalls untersucht. Das experimentelle Spektrum ist in Abbildung 15 (Seite 50) zu sehen. Bei den Berechnungen wurde eine Grundstruktur mit 0.0 kJ/mol identifiziert und eine Reihe weiterer Isomere mit Energien zwischen 9.2 und 13.6 kJ/mol. Die Grundstruktur (Konformer **c**) zeigt beide C-Termini

deprotoniert, wodurch ein Histidin-Rest als Zwitterion auftritt. Die energetisch am nächsten liegenden Konformere **a** und **b** (9.2 bzw. 9.5 kJ/mol) komplexieren das Calcium Kation mit einem neutralen und einem am C-Terminus deprotonierten Histidin-Rest. Die Strukturen und Spektren sind ebenfalls in Abbildung 15 dargestellt.

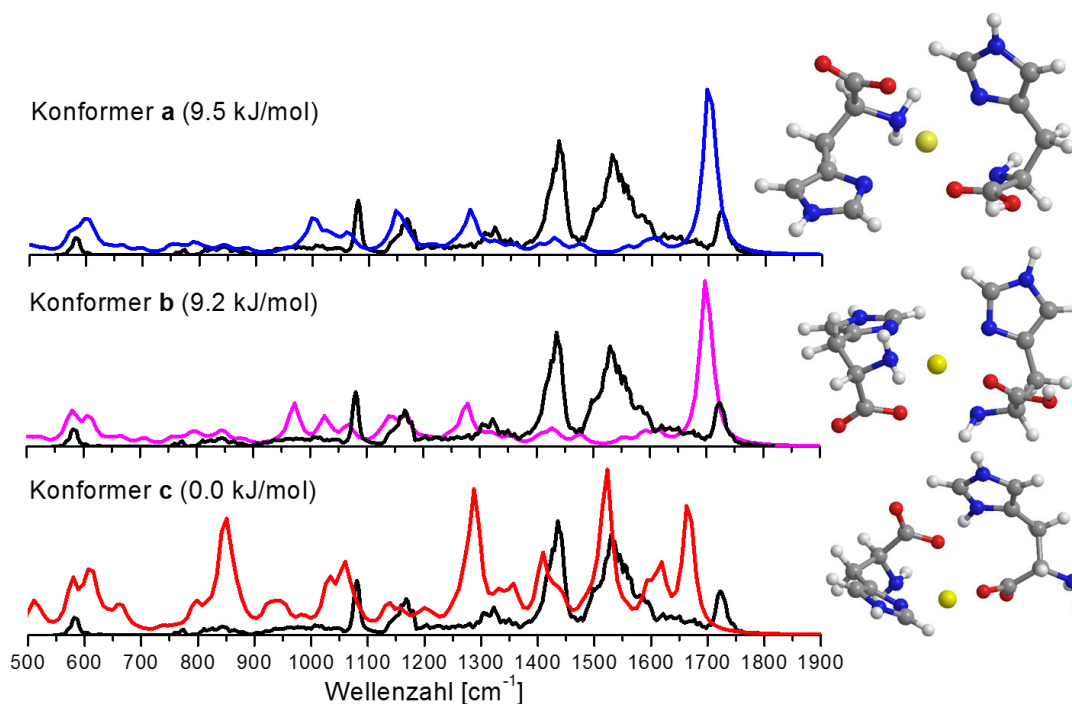


Abbildung 15. Berechnete lineare IR-Spektren drei möglicher Konformere **a**, **b** und **c** des $[\text{Ca}^{2+}(\text{His})(\text{His-H})]^+$ Komplexes bei m/z 349. Das in schwarz dargestellte Spektrum wurde experimentell bestimmt. Die Intensität der Absorption der gerechneten Spektren wurde auf die C=O Bande normiert, um den Vergleich zu vereinfachen. Die Wellenzahlen sind mit einem Faktor von 0.97 skaliert.

Die Konformere **a** und **b** komplexieren das Calcium Kation wie auch schon im Nickel Komplex sechsfach. In Konformer **c** ist Calcium jedoch nur fünffach koordiniert, da durch die zwitterionische Struktur des Histidins beide Imidazol-Stickstoffe protoniert sind und somit als mögliche Koordinationsstellen wegfallen. So entsteht hier eine stark verzerrte quadratisch pyramidale Struktur. Abbildung 16 zeigt diese Struktur durch die grün markierten Bindungen an. Auch in dieser Abbildung wurden die Wasserstoffe ausgeblendet, um eine bessere Übersichtlichkeit zu erreichen.

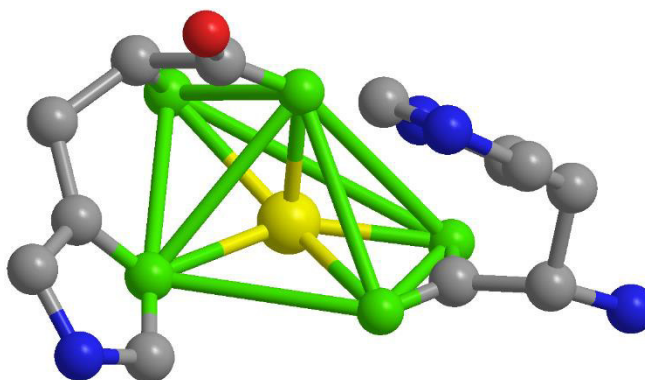


Abbildung 16. Darstellung von Konformer **c** des $[\text{Ca}^{2+}(\text{His})(\text{His-H})]^+$ Komplexes. Durch die in grün dargestellten Bindungen wird die stark verzerrte quadratisch pyramidale Struktur hervorgehoben. Um die Betrachtung zu vereinfachen, sind die Wasserstoffe ausgeblendet.

Durch die strukturelle Flexibilität des Komplexes ist Zuordnung des experimentellen Spektrums erschwert. Tabelle 8 (Seite 51) zeigt alle Bandenlagen mit der entsprechenden Schwingungsform. Konformer **c** als Grundstruktur zeigt in einigen Bereichen gute Übereinstimmungen mit dem experimentellen Spektrum, jedoch ist die charakteristische C=O Streckschwingung rotverschoben gegenüber dem experimentellen Spektrum. Die Gerüstschwingung des zwitterionischen Histidins bei 1616 cm^{-1} wird durch das experimentelle Spektrum nicht dargestellt. Die Scherschwingungen der Amino- bzw. Methylengruppen bei 1593 bzw. 1436 cm^{-1} werden hingegen gut abgebildet. Die starke Absorption im berechneten Spektrum von Konformer **c** bei 851 cm^{-1} entspricht der Kippschwingung der nicht koordinierten NH_2 -Gruppe. Diese Bande ist im experimentellen Spektrum kaum zu erkennen.

Tabelle 8. Bandenlage des experimentellen Spektrums von $[\text{Ca}^{2+}(\text{His})(\text{His-H})]^+$, sowie der drei energetisch günstigsten Konformere. Die berechneten Wellenzahlen sind mit einem Faktor von 0.97 skaliert. Die Lage der Banden ist in Wellenzahlen angegeben. Erklärung der Symbole: ν -Streckschwingung, δ -Deformationsschwingung „in plane“, γ -Deformationsschwingung „out of plane“, β -Scherschwingung, α -Gerüstschwingung, τ -Torsionsschwingung.

Schwingungsform	Experiment	Theorie		
		Konformer a	Konformer b	Konformer c
$\nu(\text{C=O})$ His-H		1698		1663
$\nu(\text{C=O})$	1721		1698	
$\beta(\text{NH}_2)$ His-H	1583		1584	1593
$\beta(\text{NH}_2)$ His		1602	1619	
	1530			
	1497			

$\nu(\text{OCO})$ Imidazol+H				1523
$\nu(\text{HC}=\text{C})$ His-H		1558	1558	
$\nu(\text{HC}=\text{N})$ His-H			1471	
$\delta((\text{N}=\text{C})\text{-H})$ His		1471		
$\beta(\text{CH}_2)$ Imidazol+H	1435			1436
$\beta(\text{CH}_2)$ His-H		1427		
$\gamma(\text{CH}_2)$ His		1349		
$\beta(\text{NC-NH})$ His			1427	
$\nu(\text{C-COO})$ Imidazol+H				1410
	1322			
	1304			
$\gamma(\text{HC-H-CH}(\text{NH}_2))$ Imidazol+H				1331/1357
$\gamma((\text{H}_2\text{N})\text{C-H})$ His-H				1287
$\nu(\text{CO}\cdots\text{Ca})$ His-H		1279	1279	
$\delta(\text{O-H})$	1168	1314/1148	1165	
$\delta((\text{COOH})\text{C-H})$		1314		
$\delta(\text{N}_\epsilon\text{-H-CH})$	1138			1139
$\tau(\text{NH}_2)$ His			1139	
$\beta(\text{NH-CH})$ His-H	1081		1069	
$\beta(\text{NH-CH})$ His		1060		
$\tau(\text{N}_\delta\text{-H})$ Imidazol+H				1060
$\gamma(\text{NH}_2)$ His-H		1025	1026/973	1034
α (Imidazol+H)				938/990/1200/1619
$\gamma(\text{NH}_2)$ Imidazol+H				851
α		877/694/659		798
α (His-H)			877/607/799	
α (His)			711	
$\gamma(\text{NH}_2)$ His		999/842	842	
$\gamma(\text{OCO})$		790		
τ (Imidazol) Imidazol+H				606
τ (Imidazol) His			668/580	
$\gamma(\text{O-H})$		755/606	668	
τ (Imidazol) His-H	584			580/659
$\delta(\text{CH-COO})$ Imidazol+H				510

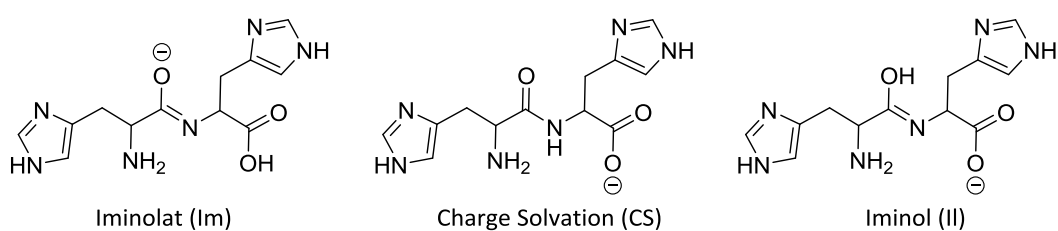
Die C=O Streckschwingungen der Konformere **a** und **b** weichen um 20 cm^{-1} von der experimentellen Lage ab. Die O-H Biegeschwingung, im Bereich von $1148\text{--}1168\text{ cm}^{-1}$, wird jedoch durch beide Konformere gut abgebildet. Die Spektren der anderen energetisch ähnlichen Strukturen sind im Anhang zu finden. Keines der berechneten Spektren deckt sich mit dem experimentellen Spektrum. Dies legt die Vermutung nahe, dass ein Gemisch aus verschiedenen Konformeren und Isomeren in der Gasphase vorhanden ist. Unterstützt wird diese These durch Merkmale im experimentellen Spektrum, welche für die Anwesenheit

einer zwitterionischen Struktur sprechen, als auch Hinweise auf einen protonierten C-Terminus geben.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass durch die Flexibilität von nicht verknüpften Histidin-Resten diverse mögliche Konformere bzw. Isomere in der Gasphase gebildet werden können. Die eindeutige Zuordnung der Nickel-Spektren konnte nicht getroffen werden, da alle berechneten Spektren sehr ähnlich sind und die einzelnen Konformere energetisch nahe beieinander liegen, sodass sie durch die Aufnahme von Photonen, ineinander überführt werden können. Dies wird durch den IRMPD Mechanismus, bei dem die Ionen durch den IVR-Prozess eine höhere innere Energie haben, möglich (vgl. Kapitel 1.1) Bei den Calcium Komplexen ist die Zuordnung unzulänglich, da das experimentelle Spektrum Merkmale von unterschiedlichen Liganden-Isomeren (ein Histidin-Ligand ist zwitterionisch, der andere am C-Terminus deprotoniert, oder nur ein Ligand ist am C-Terminus deprotoniert, wohingegen der andere Ligand „normal“, also weder protoniert, noch deprotoniert vorliegt) um das zentrale Calcium Ion aufweist. Es wird davon ausgegangen, dass verschiedene Isomere gleichzeitig in der Gas-Phase vorliegen, welche durch die hohe Energiedifferenz (mindestens 9 kJ/mol) jedoch nicht ineinander überführbar sind. Die Gruppe um *Dopfer* beobachtete dieses Phänomen bei der Untersuchung von *para*-Fluorophenol. Dieses kann in der Gasphase als Oxonium oder als Fluoronium-Ion vorliegen. Um die beiden Isomere dennoch zu unterscheiden, verwendeten sie unterschiedliche Fragmentierungskanäle. Das Oxonium-Ion verliert in der H₂O, wohingegen das Fluoronium-Ion HF verliert.⁵⁰ Eine Übertragung dieser Vorgehensweise auf die Calcium-Komplexe kann möglich sein, jedoch muss dafür die Energiehyperfläche der Komplexe und ihrer Fragmentierungen bestimmt werden, um so den jeweils wahrscheinlichsten Fragmentierungs-Kanal zu bestimmen. Wenn diese sich innerhalb der bereits identifizierten Isomere unterscheiden, kann analog zu *Dopfer* vorgegangen werden.

3.2.3 $[M^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$

Da die Komplexe der getrennten Histidine mit Nickel bzw. Calcium sehr flexibel sind und dadurch eine große Zahl an Freiheitsgraden aufweisen, sollen in der nachfolgend beschriebenen Studie die Komplexe des Histidin-Dipeptides mit Nickel und Calcium untersucht werden. Durch die Verknüpfung zweier Histidin-Aminosäuren über eine Peptidbindung, sollen die Reste in ihrer Flexibilität eingeschränkt werden. Zudem wird durch die so entstehende Peptidbindung eine weitere Koordinationsstelle angeboten. Hier soll im Besonderen die Änderung des Bindungsmotives untersucht werden, da Nickel-Kationen in der flüssigen Phase dazu tendieren Amidprotonen zu abstrahieren, während Calcium-Kationen typischerweise den sauren C-Terminus deprotonieren.^{4,118,119} Die deprotonierten HisHis-Dipeptide können drei verschiedene Tautomere bilden (vgl. Schema). Ein Iminolat (Im), bei dem das Amidproton abstrahiert wird und eine Doppelbindung zwischen dem Stickstoff und dem Carbonyl-Kohlenstoff gebildet wird, sodass der Sauerstoff eine negative Ladung trägt. Eine weitere Möglichkeit ist eine „Charge Solvation“ (CS) Struktur. Dabei ist der C-Terminus deprotoniert. Oder eine Kombination aus Im und CS, welche Iminol (II) genannt wird. Dabei ist der C-Terminus deprotoniert und das Amidproton wird auf den Carbonyl-Sauerstoff übertragen, wobei ein Iminol Strukturmotiv entsteht.



Schema 6. Drei mögliche Tautomere des deprotonierten HisHis Liganden mit der hier verwendeten Notation.¹¹² Im für Iminolat, bei der das Amidproton abstrahiert wurde und sich eine Doppelbindung zwischen dem Stickstoff und dem Carbonyl-Kohlenstoff ausbaut, wodurch der Amid-Sauerstoff eine negative Ladung trägt. CS für „charge solvation“, wobei der C-Terminus deprotoniert ist, und II für Iminol, als Kombination zwischen CS und Im.

3.2.3.1 IRMPD Spektroskopie und Computerchemische Untersuchungen

Ein direkter Vergleich der experimentellen Spektren von $[\text{Ni}^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$ (m/z 349) und $[\text{Ca}^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$ (m/z 331) zeigt Übereinstimmungen im Bereich von 580 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} sowie 1430 cm^{-1} (Abbildung 17). Diese Vibrationen können der Imidazol Seitenkette zugeordnet werden (die Lage aller Banden und Schwingungsformen können Tabelle 9 und 10 (Seiten 58 und 61) entnommen werden).

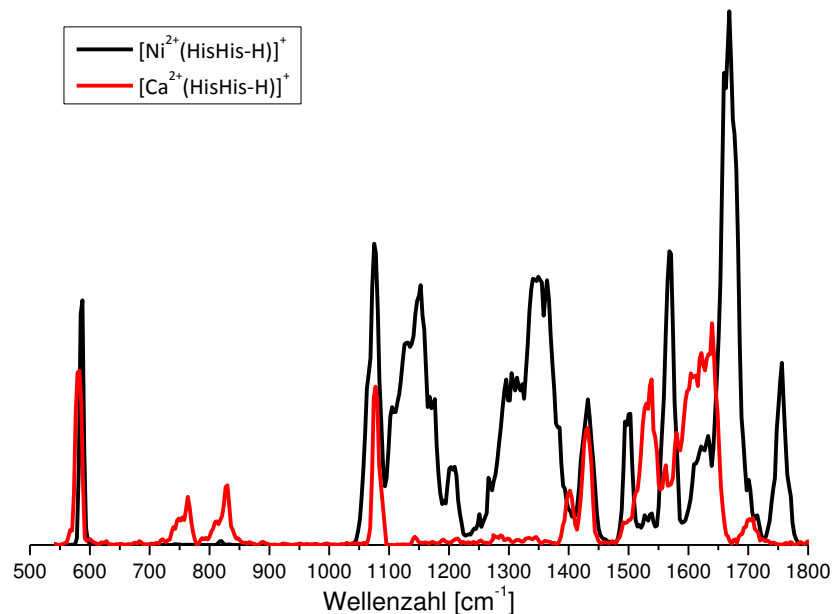


Abbildung 17. Experimentelle IRMPD-Spektren der Komplexe $[\text{Ni}^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$ und $[\text{Ca}^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$. Der Nickel Komplex ist in Schwarz und der Calcium-Komplex in Rot dargestellt.

Es sind aber auch Unterschiede erkennbar. So absorbiert der Nickel-Komplex im Bereich zwischen $1100\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$, wohingegen der Calcium-Komplex nicht resonant ist. In diesem Wellenzahlenbereich sind C-OH Streckschwingungen sowie O-H Biegeschwingungen aktiv. Es lässt also bereits ohne computerchemische Vergleiche vermuten, dass der Nickel-Komplex als Iminolat vorliegt. Die Abwesenheit dieser Absorptionen legt nahe, dass der Calcium-Komplex am C-Terminus deprotoniert ist. Die beiden Banden bei 760 cm^{-1} sowie 820 cm^{-1} sind nur im $[\text{Ca}^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$ Spektrum zu erkennen. In

dieser Region sind typischerweise Amidprotonen resonant. Auch Scherschwingungen eines deprotonierten C-Terminus sind hier zu finden. Auf den ersten Blick wird dadurch bereits ersichtlich, dass die HisHis-Liganden in beiden Komplexen an unterschiedlichen Stellen deprotoniert sind und somit unterschiedliche Struktur motive annehmen.

Im Folgenden sollen die Strukturen genauer identifiziert werden. Um eine eindeutige Zuordnung der Strukturen in den Abbildungen treffen zu können, soll hier kurz die Notation erklärt werden: Im, CS und II wurden bereits in Schema 6 beschreiben. Zur weiteren Bestimmungen werden in eckigen Klammern Großbuchstaben verwendet, welche sich auf die Spezies des koordinierten Heteroatoms beziehen. Ein „OH“ im Index bedeutet, dass die Struktur eine Wasserstoffbrücke aufweist. So bedeutet CS[OONN]_{OH} z.B., dass es sich um eine Charge Solvation Struktur handelt, bei der das Metall-Kation über zwei Sauerstoffe und zwei Stickstoffe koordiniert ist, sowie der Komplex durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert wird.

In Abbildung 18 sind sechs mögliche Strukturen für den Nickel Komplex $[\text{Ni}^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$ im Vergleich zum experimentellen Spektrum (schwarz) dargestellt. Es sind vier Im, eine II und eine CS Struktur zu sehen. Die Strukturen **a**, **b** und **c** sind die energetisch günstigsten Konformere. Struktur **d** ist energetisch wenig günstig (49.7 kJ/mol), hat aber auch das Im Strukturmotiv. Struktur **e** stellt eine II Struktur dar, welche zusätzlich durch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Iminol-Wasserstoff und dem Stickstoff des N-Terminus stabilisiert wird (II[NNNO]_{OH}). Struktur **f** stellt die CS Form dar, welche aber ebenfalls energetisch ungünstig ist (CS[NNOO]).

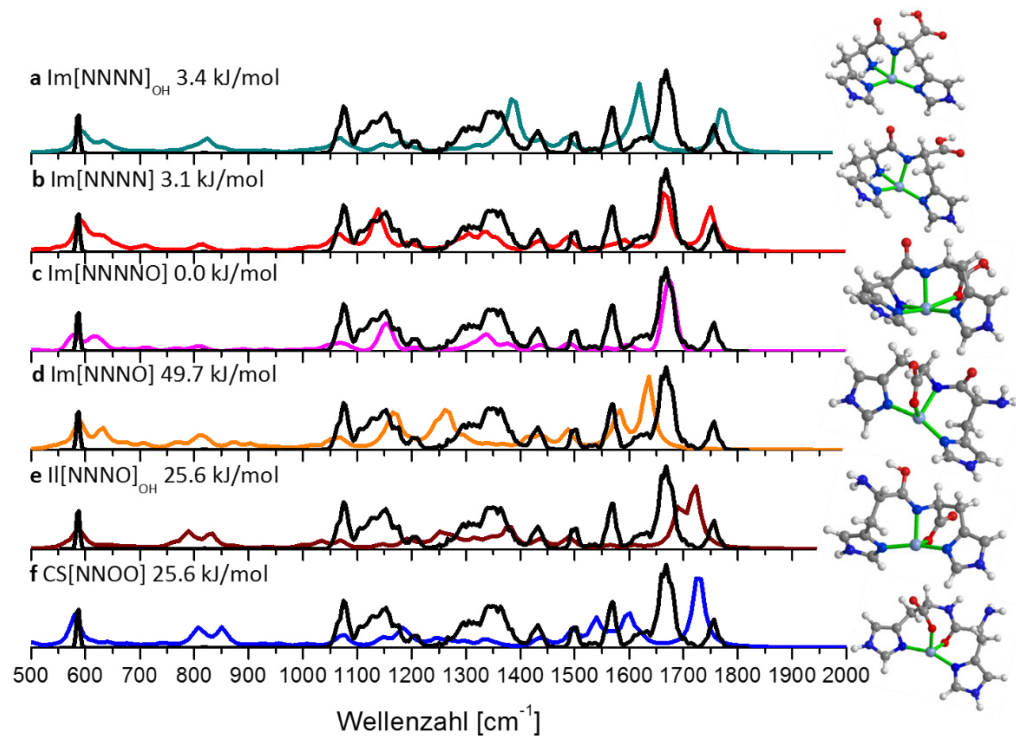


Abbildung 18. Drei energetisch günstige Strukturen für den $[\text{Ni}^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$ Komplex mit m/z 349 sind in den Zeilen a-c zu sehen. Zeile d stellt das gleiche Im Strukturmotiv dar, ist energetisch jedoch wenig begünstigt. In den Zeilen e und f sind zwei energetisch gleich ungünstige Strukturen für diesen Komplex abgebildet, jedoch ist das Strukturmotiv in e ein II und in f ein CS. Die Intensität der Absorption der gerechneten Spektren wurde auf die C=O Bande normiert, um den Vergleich zu vereinfachen. Die Wellenzahlen sind mit einem Faktor von 0.97 skaliert.¹⁰

Bei den Strukturen **a** und **b** ist das Nickel-Kation von vier Stickstoffen komplexiert und Struktur **c** ist dieses zusätzlich durch einen Sauerstoff komplexiert, sodass eine quadratisch pyramidale Geometrie entsteht. Struktur **a** wird durch eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zwischen dem Wasserstoff des C-Terminus und dem Amid Sauerstoff stabilisiert. Durch diese ist eine Bande bei 1400 cm^{-1} zu erkennen, welche C-OH Streck-schwingungen sowie CO-H Biegeschwingungen zugeordnet werden können. Diese Banden sind für Im[NNNN] und Im[NNNNO] rotverschoben zu 1150 cm^{-1} . Bei der in Zeile b gezeigte Struktur Im[NNNN] ist weder der Carbonyl-Sauerstoff des Amides, noch der C-Terminus in eine Komplexierung oder Wasserstoffbrücke involviert. Die entsprechenden Schwingungen können bei 1660 und 1750 cm^{-1} gefunden werden und stimmen mit dem experimentellen Spektrum überein. Die beiden anderen energetisch günstigen Strukturen weisen charakteristische Verschiebungen dieser Banden aufgrund ihrer Bindungssituation auf. Die C-

terminale Carbonyl-Streckschwingung in Im[NNNNO] (Zeile c) ist durch die Interaktion mit Ni²⁺ stark rotverschoben und deckt sich nun mit der Carbonyl-Peptid Bande. Auf der anderen Seite ist der Einfluss der Wasserstoffbrücke auf die Lage der Banden in Zeile a bei Im[NNNN]_{OH} zu erkennen.

Tabelle 9. Bandenlage des experimentellen Spektrums von [Ni²⁺(HisHis-H)]⁺, sowie der drei energetisch günstigsten Konformere und drei Konformeren im erweiterten Stabilitätsbereich. Die berechneten Wellenzahlen sind mit einem Faktor von 0.97 skaliert. Die Lage der Banden ist in Wellenzahlen angegeben. Erklärung der Symbole: ν -Streckschwingung, δ -Deformationsschwingung „in plane“, γ -Deformationsschwingung „out of plane“, β -Scherschwingung, α -Gerüstschwingung, τ -Torsionsschwingung. C-Terminus:1; N-Terminus:2. ¹⁰

Schwingungsform	Experiment	Theorie					
		Im[NNNN] _{OH}	Im[NNNN]	Im[NNNNO]	Im[NNNO]	II[NNNO] _{OH}	CS[NNOO]
$\nu(\text{C}=\text{O}(\text{O}))$	1756	1770	1748	1673	1636	1724	1724
$\nu(\text{C}=\text{O}(\text{N}))$	1671/1621	1619	1655	1673	1636		1602
$\nu(\text{C}=\text{N})_{\text{peptide}}$	1337-1355		1335	1339		1689	
$\delta(\text{NH}_2)$	1568		1592	1598		1610	
$\beta(\text{NH}_2)$					1548		
$\beta(\text{CH}_2)$							1436 ¹
$\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{imidazol}}$						1567	
$\nu(\text{N}-\text{C}-\text{N})$	1500/1075	1487/ 1069	1485/ 1069	1486/ 1072		1148/ 1069	1148
$\delta(\text{N}-\text{H})_{\text{imidazol}}$	1432		1440	1438			851
$\delta(\text{CH}_2)$	1206	1427			1436 ¹ / 1418 ²	1436	
$\tau(\text{CH}_2)$			1193 ¹		807	1191 ¹	1340 ¹ / 1287 ²
$\delta(\text{O}-\text{H})$	1385/1153	1387	1136	1155	1165	1383	
$\delta(\text{COO}-\text{CH})$						1313	1244
$\nu(\text{C}=\text{O}(\text{Ni}))$						1252	
$\tau(\text{NH}_2\text{C}-\text{H})$	1295-1325		1305				1069
$\nu(\text{C}-\text{OH})/$ $\delta(\text{O}-\text{H})$	1364/1170	1387/ 1180	1300/ 1135	1380	1412/ 1170	1380	
$\tau(\text{NH}_2)$		1148					
$\gamma(\text{C}-\text{H})_{\text{imidazol}}$			812	812			
$\nu(\text{HC}-\text{CH}_2)$						1032	
$\delta(\text{C}-\text{H})_{\text{imidazol}}$						1488/ 938	1497/ 807
$\tau(\text{O}-\text{H})$		824	710	615	632	790	
$\gamma(\text{NH}_2)$			635	615	903	833	
$\gamma(\text{N}-\text{H})_{\text{imidazol}}$		636					
$\tau(\text{Imidazol})$	588	593	593	581	589	589	580
α							1183

Die Peptid Carbonyl-Bande ist leicht rotverschoben, wohingegen die C-terminale Carbonyl-Bande leicht blauverschoben ist. Die Bande bei 1570 cm^{-1} im experimentellen Spektrum wird durch keines der bisher diskutierten berechneten Spektren repräsentiert, ist jedoch in der energetisch ungünstigen Struktur d Im[NNNO] zu erkennen. Es handelt sich dabei um eine Scherschwingung des nicht koordinierten N-Terminus. Die Spektren der Strukturen II[NNNO]_{OH} und CS[NNOO] (Zeilen e und f) weisen kaum Übereinstimmungen mit dem experimentellen Spektrum auf. Die im berechneten Spektrum der II Struktur gefundenen Banden bei 790 cm^{-1} und 830 cm^{-1} gehören zu kombinierten Schwingungsmodi der terminalen Amino-Gruppe sowie eine O-H...N Schwingung. Diese Banden sind im experimentellen Spektrum nicht zu finden. Bei Betrachtung der CS Struktur fällt auf, dass dem berechneten Spektrum die Absorptionen im Bereich von 1150 und 1400 cm^{-1} fehlen. Dies ist durch den deprotonierten C-Terminus zu erklären, da in dieser Region C-OH Streckschwingungen und O-H Biegeschwingungen resonant sind. Auch die Lage der Carbonyl-Bande weicht von dem experimentellen Spektrum ab. Beide zuletzt beschriebenen Strukturen liegen mit 25.6 kJ/mol deutlich entfernt von der Grundstruktur.

Abschließend lässt sich sagen, dass die drei mittels DFT-Rechnungen identifizierten energetisch günstigsten Konformere (Zeile a, b und c) eine gute Übereinstimmung mit dem experimentell erhalten Photodissoziationsspektrum zeigen. Neben dem im positiven Ionenmodus untersuchten Komplex mit m/z 349 wurde auch der Komplex $[\text{Ni}^{2+}(\text{HisHis-3H})]^+$ mit m/z 347 untersucht. Da hier keine eindeutige Übereinstimmung zwischen den experimentellen und berechneten Strukturen gefunden wurde, wird hier nicht näher auf die Ergebnisse eingegangen. Die Spektren und Strukturen können dem Anhang entnommen werden.

Wird das Metall von Nickel zu Calcium gewechselt, so wird das in schwarz dargestellte IRMPD Spektrum des Komplexes $[\text{Ca}^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$ mit m/z 331 erhalten. Dieses wird mit vier durch DFT-Rechnungen simulierten Strukturen verglichen. Zeile a stellt die Grundstruktur mit 0.0 kJ/mol dar und ist eine CS Struktur, welche über die N_δ der Imidazol Seitenkette sowie über den deprotonierten C-Terminus und den Peptid Sauerstoff koordiniert.

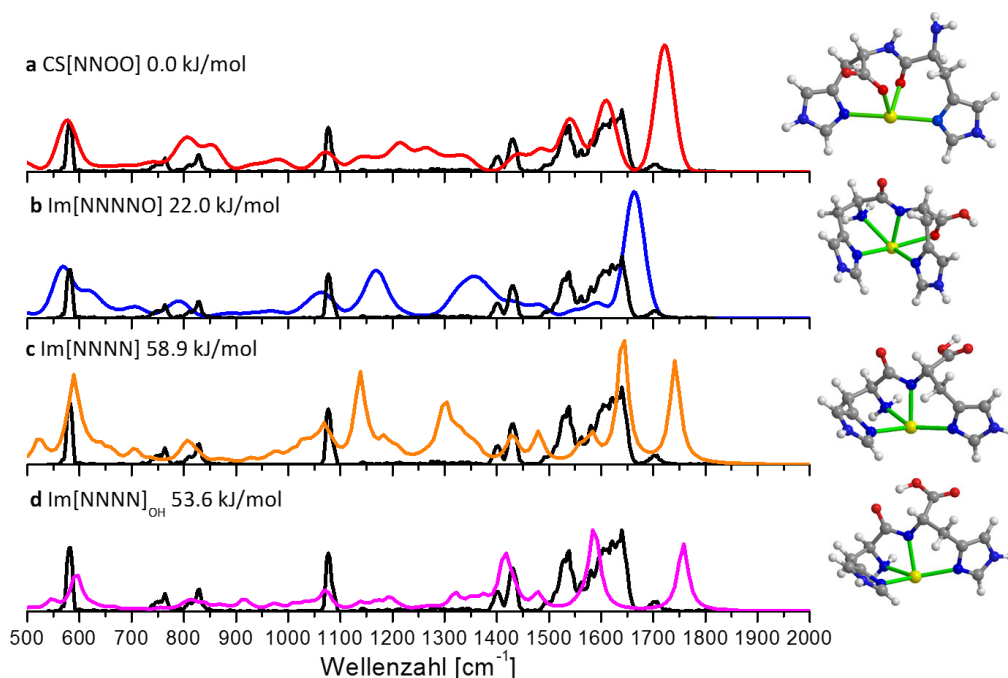


Abbildung 19. Vier mögliche Strukturen für den $[\text{Ca}^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$ Komplex mit m/z 331. Die Absorptionsintensität der gerechneten Spektren wurde auf die C=O Bande normiert, um den Vergleich zu vereinfachen. Die Wellenzahlen sind mit einem Faktor von 0.97 skaliert.¹⁰

Die in Abbildung 19 in den Zeilen b-d gezeigten Strukturen des Calcium-Komplexes sind analog zu den Strukturen a-c des Nickel-Komplexes $[\text{Ni}^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$ in Abbildung 18. Für die Rechnungen wurde lediglich das Metall ausgetauscht. Die in Abbildung 19 in Zeile b dargestellte Im Struktur des Calciums entspricht der Grundstruktur des $[\text{Ni}^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$ Komplexes. Durch das Fehlen der Absorption zwischen 1100 und 1350 cm^{-1} im experimentellen Spektrum können die Im Strukturen weitestgehend ausgeschlossen werden, da in diesem Bereich die C-OH Streckschwingung bzw. O-H Biegeschwingungen liegen. Durch die zusätzliche Wasserstoffbrücke der Struktur in Zeile d ist hier allerdings ebenfalls keine Absorption zu erkennen. Diese Struktur kann somit aufgrund der blauverschobenen C=O Bande sowie der fehlenden Absorption

um 1520 und 1620 cm^{-1} ausgeschlossen werden. Die CS-Struktur in Zeile a zeigt eine gute Übereinstimmung mit dem experimentellen Spektrum. Besonders der Bereich bei 1540 cm^{-1} in dem das Amid Proton eine Biegeschwingung aufweist, sowie bei 1608 cm^{-1} (Amid C=O Streckschwingung) ist die Übereinstimmung überzeugend. Allerdings ist die C-terminale C=O Streckschwingung leicht rotverschoben und die Intensitäten der berechneten Banden und des experimentellen Spektrums stimmen nicht überein. Dies kann durch eine geringere Laserintensität in diesem Wellenzahlenbereich in Kombination mit einer nicht linearen Leistungsabhängigkeit (Power) sowie einer nicht entdeckten Konformation liegen.^{13,115}

Tabelle 10. Bandenlage des experimentellen Spektrums von $[\text{Ca}^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$, sowie vier möglichen Konformeren. Die berechneten Wellenzahlen sind mit einem Faktor von 0.97 skaliert. Die Lage der Banden ist in Wellenzahlen angegeben. Erklärung der Symbole: ν -Streckschwingung, δ -Deformationsschwingung „in plane“, γ -Deformationsschwingung „out of plane“, β -Scherschwingung, α -Gerüstschwingung, τ -Torsionsschwingung. C-Terminus:1; N-Terminus:2.¹⁰

Schwingungsform	Experiment	Theorie			
		CS[NNOO]	Im[NNNNO]	Im[NNNN]	Im[NNNN] _{OH}
$\nu(\text{C}=\text{O}(\text{O}))$	1702	1722	1671	1742	1757
$\nu(\text{C}=\text{O}(\text{N}))$	1639	1608	1663	1642	1585
$\nu(\text{C}=\text{N})_{\text{peptide}}$					
$\delta(\text{NH}_2)$	1539	1538			
$\nu(\text{N}-\text{C}-\text{N})$	1491	1485	1064	1069/1138	1479/1070
$\delta(\text{N}-\text{H})_{\text{imidazol}}$		1135			
$\delta(\text{CH}_2)$	1432 ¹	1438 ¹		1427 ¹	
$\nu(\text{N}-\text{C}-\text{N})$	1491	1485	1064	1069/1138	1479/1070
$\delta(\text{CH}_2)$	1432 ¹	1438 ¹		1427 ¹	
$\gamma(\text{CH}_2)$		1341 ¹	1355 ¹		1375 ¹
$\tau(\text{CH}_2)$				1182 ¹	1174 ¹
$\delta(\text{O}-\text{H})$			1167		1414
$\nu(\text{C}-\text{OH})$					1191
$\nu(\text{C}-\text{NH}_2)$	1077	1072		1034	
$\nu(\text{N}-\text{Ca})$		978			
$\gamma(\text{C}-\text{H})_{\text{imidazol}}$			789	807	816
$\beta(\text{COO})$	830	809			
$\delta(\text{C}-\text{H})_{\text{imidazol}}$		1217	1482	1479	1139
$\tau(\text{O}-\text{H})$			702		912
$\gamma(\text{NH}_2)$		855		1582	
$\gamma(\text{N}-\text{H})_{\text{peptide}}$	764	790			
$\tau(\text{Imidazol})$	583	577	568/571	590 ¹ /587 ²	597 ¹ /591 ²
$\delta(\text{CH}_2)$	1432 ¹	1438 ¹		1427 ¹	

Durch diesen Datensatz konnten erste Einblicke in das Bindungsmotiv von $[M^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$ Komplexen gewonnen werden. Durch Kombination von DFT-Rechnungen und IRMPD Spektroskopie konnte für den entsprechenden Nickel-Komplex $[\text{Ni}^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$ eine Iminolat Struktur und für den Calcium Komplex $[\text{Ca}^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$ eine Charge Solvation Struktur identifiziert werden. Das stark bindende Ni^{2+} Kation deprotoniert den Amid-Stickstoff und provoziert so eine Tautomerisierung zum Iminolat. Dieses Verhalten unterstützt die These, dass Nickel bevorzugt an Lewis-basische Stickstoffe und nicht an Sauerstoffe koordiniert. Diese Ergebnisse könnten die nicht ausreichende Stabilität von $[\text{Ni}^{2+}(\text{His-H})]$ (vgl. 3.2.1 $[\text{Ni}^{2+}(\text{His-H})]^+$) für ESI-MS Experimente erklären. Der Nickel-Komplex mit zwei Histidinen $[\text{Ni}^{2+}(\text{His})(\text{His-H})]$ (vgl. 3.2.2 $[\text{M}^{2+}(\text{His})(\text{His-H})]^+$) ist jedoch stabil genug für eine Charakterisierung, da hier ausreichend Stickstoffe für eine Komplexbildung zur Verfügung stehen.

Dunbar untersuchte ebenfalls Komplexe mit Calcium, welches durch aromatische Aminosäuren komplexiert wurde. Er untersuchte dabei Komplexe mit Phenylalaninphenylalanyl-Liganden.¹²⁰ In der von ihm durchgeführten Studie bildeten sich Komplexe, bei denen das Calcium-Kation zwischen zwei Phenyl-Ringen eingeschlossen wird. *Dunbar* nennt diese Komplexe Sandwich-Komplexe. Eine solche Kation- π -Wechselwirkung wurde für die Calcium-Histidinhistidyl Komplexe nicht beobachtet. Stattdessen interagieren die Imidazol-Stickstoffe über das freie Elektronenpaar direkt mit dem Calcium-Kation.

3.3 Phosphorylierung von Histidin und seinen Derivaten

Die Phosphorylierung von Proteinen stellt eine reversible, post-translationale Modifikation dar und kann somit die Faltung von Proteinen, deren Aktivität oder auch die subzelluläre Lokalisierung beeinflussen.¹²¹ Die Phosphorylierung ist dadurch an wichtigen biochemischen Prozessen, wie der Signalübertragung, oder auch dem programmierten Zelltod (Apoptose) beteiligt.^{122,123} Bereits 1906 wurde entdeckt, dass das Protein Vitellin phosphoryliert ist¹²⁴, es dauerte

jedoch bis 1932 bevor herausgefunden wurde, dass es sich um Phosphoserin (**14**) handelt.¹²⁵

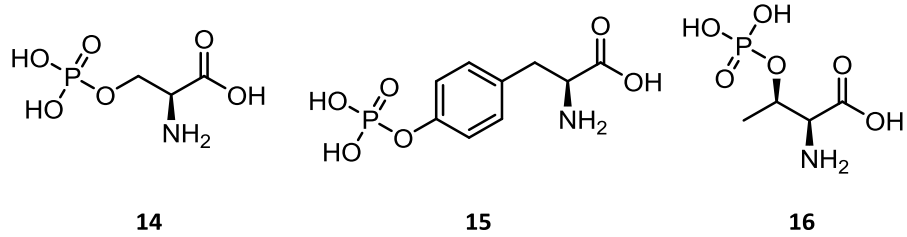
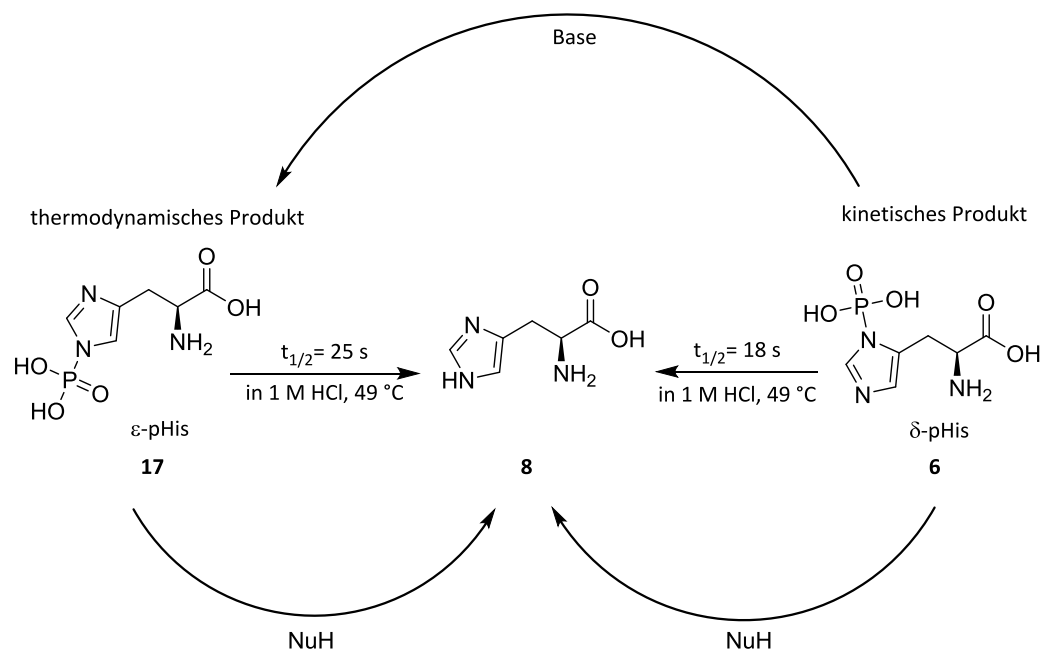


Abbildung 20. Phosphoserin (**14**), Phosphotyrosin (**15**) und Phosphothreonin (**16**).

Durch Kinasen werden Serin, Tyrosin, Threonin und auch Histidin phosphoryliert, und durch Phosphatasen dephosphoryliert, die Phosphorylierung von Serin ist dabei die in Proteinen am häufigsten beobachtete.¹²⁶ In Abbildung 20 sind die phosphorylierten Spezies von Serin, Thyrosin und Threonin dargestellt. Es ist zu erkennen, dass diese drei Vertreter der Aminosäuren Phosphoester bilden. Beim Histidin ist dies nicht möglich. Histidin bildet eine P-N-Bindung über den Imidazol-Ring aus.



Schema 7. Beide möglichen Isomere für pHis. Angegeben ist die Halbwertszeit für die Dephosphorylierung von **17** und **6** zu Histidin (**8**). Nu kann jedes Nukleophil sein.^{127,128}

Weisen die eben genannten Aminosäuren nur jeweils eine mögliche Phosphorylierungsstelle auf, so sind es beim Histidin zwei. Schema 7 zeigt die möglichen Konstitutionsisomere **6** und **17** des phosphorylierten Histidins. Anhand des Schemas ist zu erkennen, dass die Phosphorylierung von Histidin deutlich komplexer ist als bei z.B. Serin. Wird **8** phosphoryliert, so bildet sich zunächst **6** als kinetisches Produkt. Unter leicht basischen Bedingungen, wie es bei der Phosphorylierung von Peptiden üblich ist, bildet sich **17**.¹²⁷ Durch nukleophile Angriffe oder unter sauren Bedingungen dephosphorylieren beide Isomere und es entsteht Histidin. Beide Isomere konnten *in vivo* nachgewiesen werden.¹²⁸

Im Vergleich zu den in Abbildung 20 gezeigten Phosphoester-Aminosäuren ist Phosphohistidin (pHis) aufgrund seiner P-N Bindung empfindlicher gegenüber der Hydrolyse. Die Gibbs Energie ΔG° liegt für die Hydrolyse von pHis zwischen -50 und -54 kJ/mol, wohingegen ΔG° für die Hydrolyse von Phosphoester-Aminosäuren zwischen -27 und -40 kJ/mol liegt. Durch die hohe Energie dieser Phosphoamidat-Bindung kann die Phosphoryl-Gruppe aber auch leichter auf Zielmoleküle übertragen werden, was durch phosphorabhängige Signalsysteme in Bakterien ausgenutzt wird.¹²⁹ Um die genaue Rolle der Phosphorylierung von Histidin zu verstehen, wäre die Entwicklung von pHis-spezifischen Antikörpern wichtig, jedoch eignet sich pHis aufgrund seiner Hydrolyseempfindlichkeit nicht zu Generierung dieser. Deshalb entwickelte die Gruppe um *Jackson* unnatürliche, stabile Aminosäure-Analoga von pHis, um so pHis-artige Antikörper zu generieren.¹³⁰

All diese Tatsachen zusammen, zeigen bereits, dass eine genauere Betrachtung der Isomere von pHis notwendig ist, sich jedoch als schwierig erweisen kann. Die Synthesen der in diesem Abschnitt vorgestellten Analyten wurde, sofern nicht anders angegeben, von *G. Hemmer* im Rahmen seines E-Modul Praktikums durchgeführt.¹³¹

3.3.1 pHis

Zunächst soll pHis mittels ESI-MS und FELIX untersucht werden. Im Gegensatz zu allen bisherigen Messungen wurde pHis im negativen Modus gemessen, da die Synthese unter leicht basischen Bedingungen durchgeführt wurde. Auch die FELIX Experimente wurden im negativen Ionen-Modus durchgeführt. pHis kann an verschiedenen Stellen deprotoniert werden. Der pK_S -Wert der Protonen an der Amino-Gruppe liegt bei 9.1, der des Protons am C-Terminus bei 1.9 und der erste pK_S -Wert der Phosphoryl-Gruppe liegt bei ca. 1.^{104,132} Diese Werte lassen vermuten, dass die Phosphoryl-Gruppe deprotoniert vorliegt. Die genannten pK_S -Werte wurden allerdings in der Lösung und nicht im Vakuum bestimmt. Die Acidität von Protonen in der Gasphase ist aber nicht immer gleich der Acidität in Lösung. So untersuchten *Steill* und *Oomens* die Deprotonierung von *para*-Hydroxybenzoesäure in der Gasphase. In Lösung ist das Proton der Carbonsäure acider, als das der OH-Gruppe. In der Gasphase ist es umgekehrt, da bei einer Deprotonierung der OH-Gruppe die negative Ladung stärker delokalisiert ist. In Lösung fällt diese Delokalisierung weniger stark ins Gewicht, da die hier elektrostatischen Wechselwirkungen, sowie Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der deprotonierten Carbonsäure und einem protischen Lösungsmittel zu einer Stabilisierung führen.²⁸

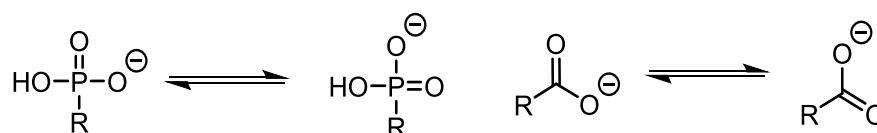


Abbildung 21. Direkter Vergleich der Stabilisierung der negativen Ladung bei Deprotonierung einer Phosphoryl-Gruppe (links) und einer Carbonsäure (rechts). R sein hier ein beliebiger Alkylrest.

In Abbildung 21 sind die Resonanzstrukturen der deprotonierten Phosphoryl-Gruppe, sowie der deprotonierten Carbonsäure zu sehen. In keiner der beiden Gruppen ist die negative Ladung besser delokalisiert als in der andern. Deshalb kann in diesem Fall davon ausgegangen werden, dass die in der Lösung ermittelten Aciditäten sich auch in der Gasphase widerspiegeln. Für die

Berechnungen der Strukturen wurde somit davon ausgegangen, dass die Phosphoryl-Gruppe deprotoniert vorliegt.

Bedingt durch die Synthese liegt eine hohe Salzfracht vor. Nichtsdestotrotz konnte ein stabiles Spray erhalten werden und sowohl die akkurate Masse als auch ein IRMPD Spektrum aufgenommen werden. In Abbildung 22 ist das experimentelle Spektrum von pHis mit m/z 234 (Fragmentationen sind im experimentellen Teil zu finden) dargestellt. Es wird mit drei berechneten IR-Spektren von **17** verglichen. Die drei Strukturen sind energetisch am günstigsten. Die Konformere **a** und **c** zeichnen sich durch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem N-Terminus und dem N_δ des Imidazol-Rings aus. Diese kommt auch in Konformer **b** vor, ist aber durch den größeren N··H Abstand schwächer. Konformer **b** weist eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zwischen dem C-Terminale OH und einem Sauerstoff der Phosphoryl-Gruppe auf. Das experimentelle Spektrum wird durch die Carbonyl-Streckschwingung bei 1730 cm⁻¹, sowie eine *in plane* Schwingung des Imidazol C-H bei 1470 cm⁻¹, eine *in plane* O-H Biegeschwingung des C-Terminus bei 1340 cm⁻¹, einer P=O Streckschwingung im Bereich von 1120 cm⁻¹ und einer (P)O-H *in plane* Biegeschwingung im Bereich von 800 cm⁻¹ dominiert (vgl. Tabelle 11, Seite 67). Das Spektrum von Konformer **a** weist eine gute Übereinstimmung mit dem experimentellen Spektrum auf, allerdings ist die Lage der Banden leicht rotverschoben. Auch das Spektrum von Konformer **c** weist eine ähnliche Rotverschiebung der Bandenlagen, abgesehen von der Carbonyl-Bande, welche leicht blauverschoben ist, auf.

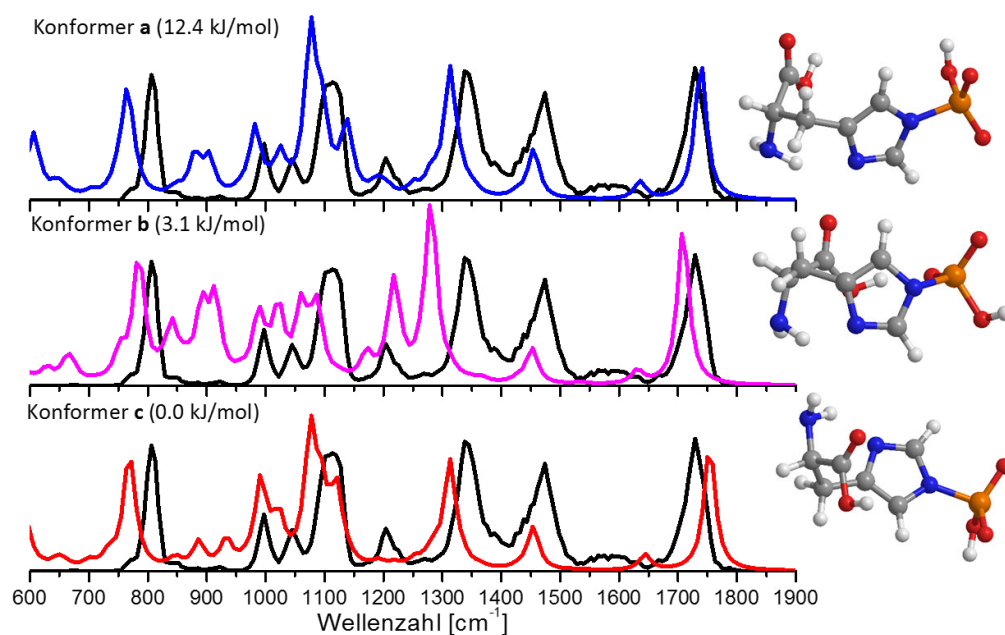


Abbildung 22. Experimentelles Spektrum von pHis im Vergleich zu den drei energetisch günstigsten Konformeren von **17**. Die berechneten Spektren wurden mit einem Faktor von 0.97 skaliert. Die Intensitäten dieser Spektren wurde auf die Carbonyl-Streckschwingung normiert um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen.

Durch die Wasserstoffbrücke des C-Terminales OH in Konformer **b** ist die *in plane* Biegeschwingung hier leicht blauverschoben zu 1220 cm^{-1} . Dadurch entsteht eine Bande, welche bei einer generellen Rotverschiebung des berechneten Spektrums keine Übereinstimmung im experimentellen Spektrum findet. Alle drei berechneten Spektren weisen im Bereich von 850 bis 950 cm^{-1} Absorptionen auf, welche nicht im experimentellen Spektrum gefunden wurden. In diesem Wellenzahlenbereich ist die CH_2 Torsionsschwingung resonant.

Tabelle 11. Bandenlage und Schwingungsform des experimentellen Spektrums von pHis sowie den drei energetisch günstigsten Konformeren von **10**. Die berechneten Wellenzahlen sind mit einem Faktor von 0.97 skaliert. Die Lage der Banden ist in Wellenzahlen angegeben. Erklärung der Symbole: ν -Streckschwingung, δ -Deformationsschwingung „*in plane*“, γ -Deformationsschwingung „*out of plane*“, β -Scherschwingung, α -Gerüstschwingung, τ -Torsionsschwingung.

	Experiment	Theorie		
Schwingungsform		Konformer a	Konformer b	Konformer c
$\nu(\text{C}=\text{O}(\text{O}))$	1729	1741	1706	1749
$\beta(\text{NH}_2)$		1635	1630	
$\delta((\text{N})\text{C}-\text{H}(\text{N}))$	1470	1453	1453	1453

$\delta(\text{O-H})$	1338/1204	1313/1191	1217	1598
$\nu(\text{P=O})$	1338/1120	1078	1279	1313/1078
α		1139	1086/1060/ 997/842/632	1121/650
$\tau((\text{C})\text{H}-(\text{C})\text{H}-\text{H})$			1174	
$\delta((\text{P})\text{O}-\text{H})$	1045	1025	1025	1017
$\gamma(\text{NH}_2)$	998	982/903	990	990/938
$\tau(\text{CH}_2)$		877		886/842
$\nu(\text{P-OH})$	806	764	781	772
$\gamma(\text{O-H})$		606/571	912/894/755	702/589/571

Allgemein stimmen die Konformer-Spektren von **a** und **c** mit dem experimentellen Spektrum überein. Dies lässt darauf schließen, dass sie gleichzeitig in der Gasphase vorliegen, obwohl Konformer **a** mit 12.4 kJ/mol deutlich weniger stabil sein sollte.

Tabelle 12. Vergleich der relative Energie der Konformere a-c von pHis. Es werden die relativen Energien bei Berechnung des „nackten“ Moleküls im Vakuum (*in vacuo*) mit denen in Methanol (PCM) verglichen.

	Relative Energie <i>in vacuo</i> (kJ/mol)	Relative Energie in Methanol (kJ/mol)
Konformer a	12.4	9.6
Konformer b	3.1	22.4
Konformer c	0.0	0.0

Die Übereinstimmung von Konformer **b** ist nicht überzeugend, auch wenn diese Struktur energetisch mit 3.1 kJ/mol nur wenig höher liegt als die Grundstruktur. Wird die Energie der drei Konformere in Methanol mittels PCM bestimmt (Tabelle 12 zeigt einen direkten Vergleich der relativen Energie), so ist Konformer **b** um 22.4 kJ/mol weniger stabil als die Grundstruktur und Konformer **a** nur noch 9.6 kJ/mol. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass wie auch schon im Ergothionein-Fall die Struktur aus der gelösten Phase zu einem gewissen Anteil in die Gasphase übertragen wird.

3.3.2 pHis+Nickel

In einem weiteren Schritt solle pHis nun als Ligand für Nickel verwendet werden. Es soll der Einfluss weiterer potentieller Bindungsstellen auf die Stabilität der Komplexe untersucht werden. In vorherigen Experimenten

konnte bereits gezeigt werden, dass ein einzelnes Histidin Molekül nicht ausreicht, um ein Nickel-Kation zu komplexieren (vgl. Kapitel 3.2.1 $[\text{Ni}^{2+}(\text{His-H})]^+$). Die Phosphorylierung ermöglicht eine zusätzliche Bindungsstelle, sodass eine erhöhte Flexibilität und Chelat-artige Komplexe realisiert werden könnten. Es wurden die negativ geladenen Moleküle $[\text{Ni}^{2+}(\text{pHis-3H})]^-$ untersucht, was bedeutet, dass der pHis Ligand drei negative Ladungen aufweisen muss. Für diese Experimente wurde Histidin mit Kaliumphosphoamidat und Nickelchlorid in H_2O gelöst und mit Methanol verdünnt.

In den für die Identifizierung herangezogenen berechneten Spektren liegt das Nickel-Ion als Triplett vor. In Abbildung 23 (Seite 69) sind die zwei energetisch günstigsten Konformere des $[\text{Ni}^{2+}(\text{pHis-3H})]^-$ Komplexes mit m/z 290 (**18**) dargestellt. Die für die Generierung des experimentellen Spektrums verwendeten Fragmentationen können dem entsprechenden Unterkapitel im experimentellen Teil entnommen werden. In schwarz ist das experimentelle Spektrum zu sehen. Konformer **a** wurde aus einer durch *Fenn* veröffentlichten Struktur eines Histidin Komplexes mit Cadmium und Zink abgeleitet.¹¹⁵

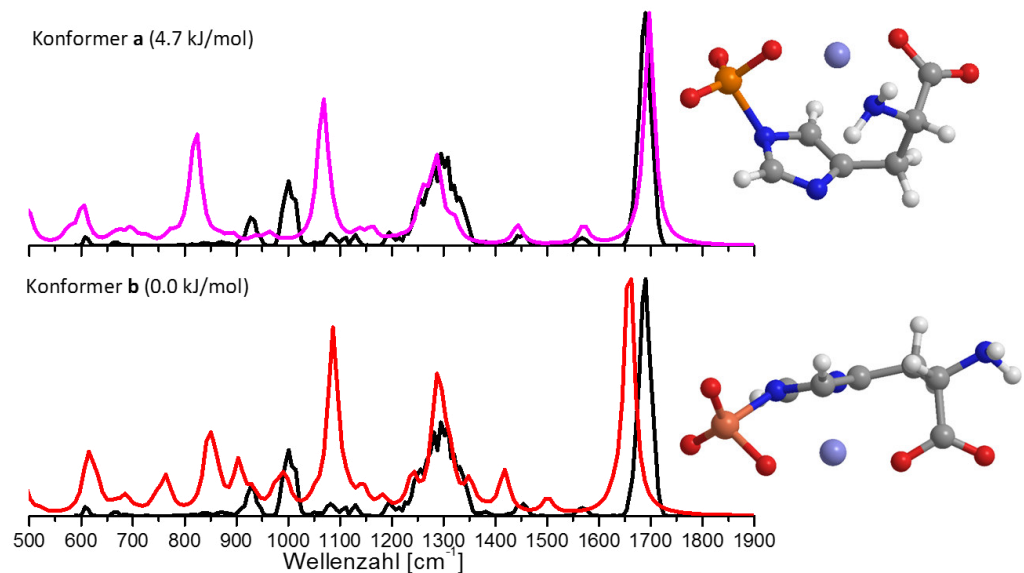


Abbildung 23. Experimentelles Spektrum von $[\text{Ni}^{2+}(\text{pHis-3H})]^-$ im Vergleich zu den zwei energetisch günstigsten Konformeren von **18**. Die berechneten Spektren wurden mit einem Faktor von 0.97 skaliert. Die Intensitäten dieser Spektren wurde auf die Carbonyl-Streckschwingung normiert, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen

Konformer **b** hingegen stellt ebenfalls einen Vertreter der Chelat-artigen Liganden dar, bei dem das Nickel-Kation durch einen Sauerstoff der Phosphoryl-Gruppe, des deprotonierten C-Terminus und das π -System des Imidazol-Rings chelatisiert. In Konformer **a** wird das Kation nicht durch den Imidazol-Ring, sondern durch den N-Terminus komplexiert.

Tabelle 13. Bandenlage und Schwingungsform des experimentellen Spektrums von $[\text{Ni}^{2+}(\text{pHis-3H})]^-$ sowie den zwei energetisch günstigsten Konformeren von **18**. Die berechneten Wellenzahlen sind mit einem Faktor von 0.97 skaliert. Die Lage der Banden ist in Wellenzahlen angegeben. Erklärung der Symbole: ν -Streckschwingung, δ -Deformationsschwingung „in plane“, γ -Deformationsschwingung „out of plane“, β -Scherschwingung, α -Gerüstschwingung, τ -Torsionsschwingung.

Schwingungsform	Experiment	Theorie	
		Konformer a	Konformer b
$\nu(\text{C}=\text{O}(\text{O}))$	1690	1698	1663
$\beta(\text{NH}_2)$	1567	1575	
$\delta((\text{N})\text{C}-\text{H}(\text{N}))$	1454	1444	1505
$\tau(\text{CH}_2)$	1320	1313/1139	1418
$\nu(\text{P}=\text{O})$	1082	1287	1086
$\delta((\text{N})\text{C}-\text{H}(\text{C}))$			1348
$\delta(\text{CH}_2)$	1288	694	1287
$\delta((\text{NH}_2)\text{C}-\text{H})$			1244
α		1313	685
$\nu(\text{N}=\text{C}(\text{H}))$	1130		1139
	1015		
	1001		
$\nu(\text{(P)N}-\text{C})$		1069	
$\gamma((\text{NH}_2)\text{C}-\text{H})$		1261	990
$\tau(\text{NH}_2)$	1195/1288	1165	1183/1287
Ringkontraktion		964	
$\nu(\text{P}-\text{O}(\text{Ni}))$		825	851
$\gamma(\text{NH}_2)$			903
$\gamma((\text{N}=\text{C})\text{C}-\text{H})$			763
$\delta(\text{P}-\text{O}(\text{Ni}))$	607	606	
$\tau(\text{Imidazol})$			615
	927		

Das berechnete Spektrum von Konformer **a** stimmt hinsichtlich der Bandenlage und Absorptionsintensität im Bereich von 1150 cm^{-1} bis 1900 cm^{-1} gut mit dem experimentellen Spektrum überein. Die Absorptionen der $\text{P}=\text{O}$ Schwingungen bei 825 cm^{-1} , sowie die $(\text{P})\text{N}-\text{C}$ Streckschwingung bei 1070 cm^{-1} sind allerdings nicht zu erkennen. Das Spektrum von Konformer **b** weist, analog zu Konformer **a**, im gleichen Wellenzahlenbereich eine gute Übereinstimmung auf, allerdings

ist die Carbonyl-Bande leicht rotverschoben. Zudem wird das berechnete IR-Spektrum von einer starken P=O-Bande bei 1086 cm^{-1} und einer weniger starken P=O Bande bei 851 cm^{-1} dominiert. Diese sind im experimentellen IRMPD-Spektrum nicht vorhanden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass in den phosphorylierten Komplexen, im Vergleich zum einfachen Histidin, ausreichend Bindungsstellen vorhanden sind, um ein Nickel-Kation zu stabilisieren. Auch der Einfluss des Lewis-basischen Stickstoffes auf das Strukturmotiv scheint sich hier widerzuspiegeln. In der Grundstruktur **b** ist die Amino-Gruppe nicht an der Komplexierung beteiligt. Das berechnete Spektrum von Konformer **a** weist eine bessere Übereinstimmung mit dem Experiment auf und hier ist der Amino-Stickstoff an der Komplexierung beteiligt. Dieser Befund deckt sich auch mit den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit, nach der Nickel durch Stickstoff bevorzugt komplexiert wird. Die analogen Komplexe mit Calcium konnten nicht charakterisiert werden.

3.3.3 Phosphorylierung von Hercynin

Zur weiteren Untersuchung des Grundmotives von Histidin soll das entsprechende Betain-Derivat Hercynin ebenfalls phosphoryliert werden. Dazu wurde zunächst Hercynin analog zur in Kapitel 5.1.2 dargestellten Methode synthetisiert und dieses dann nach der literaturbekannten Methode phosphoryliert.¹³³ Der so erhaltene Komplex wurde mittels IRMPD Spektroskopie untersucht. In Abbildung 24 (Seite 74) ist in schwarz das experimentelle Spektrum von pHercynin mit m/z 278 zu sehen. Die zur Erzeugung des experimentellen Spektrums verwendeten Fragmente können dem experimentellen Teil dieser Arbeit entnommen werden. Farbig dargestellt sind drei mögliche Konformere **a**, **b** und **c**. Konformer **c** ist dabei die Grundstruktur und am N ϵ phosphoryliert. Konformer **b** ist am N δ phosphoryliert und liegt bereits im erweiterten Stabilitätsbereich. Es fällt auf, dass die Lage der Carbonyl-Bande im experimentellen Spektrum signifikant rotverschoben ist gegenüber den berechneten Spektren der Konformere **b** und **c**. Um diese Verschiebung besser zu verstehen, wurden weitere Strukturen berechnet, bei denen der C-Terminus deprotoniert und der Imidazol-Ring protoniert ist. Die unter diesen Bedingungen energetisch günstigste Struktur resultiert in Konformer **a**. Dieses liegt mit 71 kJ/mol deutlich über der Grundstruktur. Die Lage der Carbonyl-Bande stimmt allerdings mit der im experimentellen Spektrum fast überein. Die restlichen Banden passen, wie auch bei den Konformeren **b** und **c** nicht zum experimentellen Spektrum. Wird die Energie der Konformere nun in Methanol mittels PCM Model bestimmt, ändert sich die Reihenfolge so, dass Konformer **a** ca. 184 kJ/mol stabiler ist, als Konformer **c**.

Dieses Ergebnis lässt auch hier die Vermutung zu, dass die zwitterionische Form aus der flüssigen Phase in die Gasphase transferiert wird. Da aber weder die Gasphasen-Strukturen, noch die PCM Strukturen das experimentelle Spektrum ausreichend repräsentieren, scheinen nicht alle möglichen Konformere gefunden worden zu sein, oder das experimentelle Spektrum durch eine nicht

ausreichende Stabilität des Sprays nicht verlässlich zu sein. Es ist aber zu beachten, dass die Gruppe um Johnson beobachtete, dass die C=O-Bande um bis zu 90 cm^{-1} rotverschoben wird, wenn der Sauerstoff eine Akzeptor-Rolle in einer intramolekularen Wasserstoffbrücke annimmt.¹³⁴ In Konformer **c** ist dies der Fall, da hier eine Wasserstoffbrücke zwischen den Wasserstoffen der Amino-Methylgruppe und dem C=O gebildet wird. Dies wird durch die α -Acidität der Methyl-Protonen möglich, welche durch den Elektronenzug des Stickstoffs induziert wird.¹³⁵ Diese wird in den Rechnungen möglicherweise nicht ausreichend berücksichtigt, sodass die Unterschiede zwischen Theorie und dem experimentellen Spektrum erklärt werden können. Auch können anharmonische Wechselwirkungen hier eine Rolle spielen. Die Gruppe um *Asmis* untersuchte 2016 das protonierte Wasser-Pentamer und das perdeuterierte Analogon und stellte fest, dass nicht alle Banden im experimentellen IR-Spektrum durch harmonische Berechnungen reproduziert werden konnten.¹³⁶ Sie stellten fest, dass die dritte O-D Vibration des Kern-D₂O Moleküls um über 200 cm^{-1} blauverschoben war, wenn die Berechnungen harmonisch durchgeführt wurden.¹³⁶

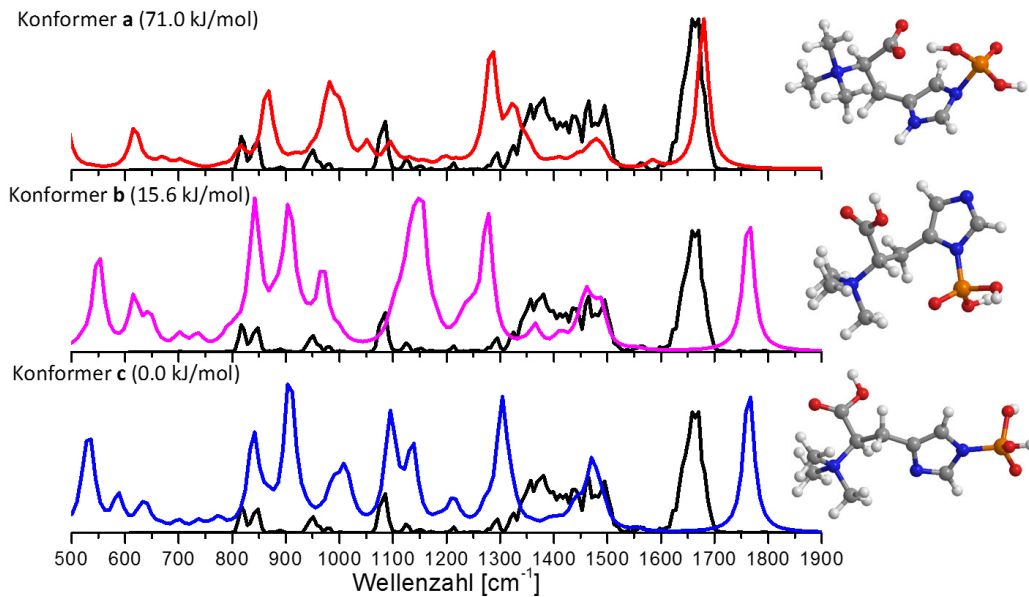


Abbildung 24. Experimentelles Spektrum von [pHercynin]⁺ im Vergleich zu drei möglichen Konformeren. Die berechneten Spektren wurden mit einem Faktor von 0.97 skaliert. Die Intensitäten dieser Spektren wurde auf die Carbonyl-Streckschwingung normiert um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen.

Bei genauerer Betrachtung der Carbonyl-Bande ist zu erkennen, dass diese eine Feinstruktur aufweist. Dies könnte ein Hinweis sein, dass zwei Strukturen gleichzeitig in der Gasphase vorliegen, oder dass es Probleme mit dem Laser gab. Abschließend lässt sich sagen, dass sich eine Vielzahl möglicher Erklärungen anbietet, um die Abweichung des experimentellen Spektrums von der Grundstruktur zu deuten. Vermutlich liegt eine zwitterionische Form vor, welche in Lösung günstig ist und in der Gasphase erhalten bleibt.

3.3.4 pHisHis

Wie in Kapitel 3.2 erläutert, treten in Proteinen häufig nicht nur ein isoliertes Histidin auf, sondern gleich Histidin-reiche Domänen. Um auch hier erste Einblicke in den Einfluss der Phosphorylierung zu erlangen, wurde das HisHis-Dipeptid ebenfalls phosphoryliert und mittels IRMPD Spektroskopie untersucht. Das Histidin-Dipeptid bietet durch die zwei Imidazol-Ringe vier mögliche Phosphorylierungsstellen an. Basierend auf den Ergebnissen der vorherigen Studien mit Histidin und Hercynin wird angenommen, dass die

Imidazole an der N₆ Position phosphoryliert werden. Unklar war jedoch, ob am C- oder am N-terminalen Imidazol. In Abbildung 25 ist das experimentelle Spektrum von [pHisHis-H]⁻ mit m/z 371 in schwarz dargestellt. Die zur Generierung des experimentellen IRMPD-Spektrums sind in der entsprechenden Sektion im experimentellen Teil dieser Arbeit zu finden.

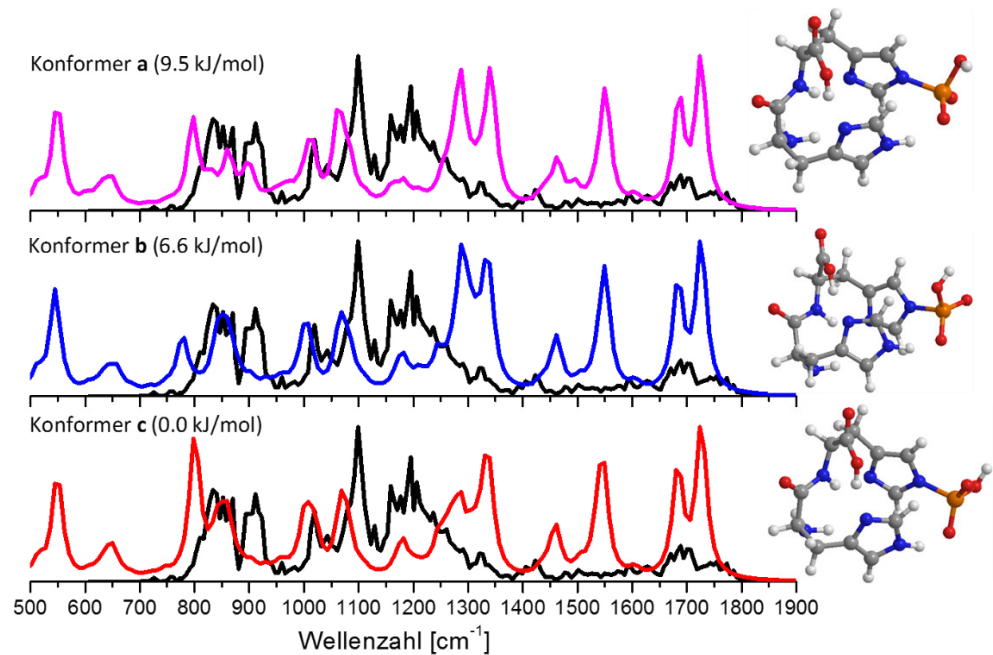


Abbildung 25 Experimentelles Spektrum von [pHisHis-H]⁻ mit m/z 371 in schwarz im Vergleich zu den drei energetisch günstigsten berechneten Konformeren von **5**. Alle berechneten Konformere sind am N₆ des C-terminalen Imidiazol-Rings phosphoryliert. Die berechneten Spektren wurden mit einem Faktor von 0.97 skaliert. Die Intensitäten dieser Spektren wurde auf die Carbonyl-Streckschwingung normiert um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen.

Auffällig ist, dass die Banden im Spektrum sehr breit sind. Zudem ist fast keine Basislinie zu erkennen. Diese Indikatoren müssen bei der Interpretation der Spektren berücksichtigt werden. Ein solches Spektrum kann durch eine starke Sekundärfragmentierung der Produktionen entstehen, oder auch durch ein nicht ausreichend stabiles Spray.

Um mögliche Artefakte ausschließen zu können, wurden die gefundenen Produktionen mit den in der Literatur bekannten Ionen von Phosphopeptiden verglichen.¹³⁷ Die Moleküle verlieren in der Fragmente mit 18 bzw. 98 Da. Dies

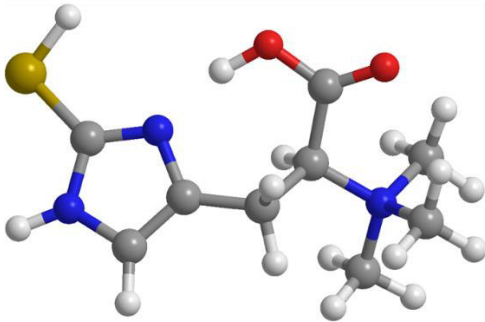
entspricht Wasser und HPO_3 mit Wasser. Dies sind auch in der Literatur bekannte Fragmente bei der Untersuchung von phosphorylierten Peptiden. Die berechneten Spektren weisen zwei CO-Banden im Bereich von 1680 und 1730 cm^{-1} auf, welche dem Peptid-CO bzw. dem C-Terminus zugeordnet werden können. Im experimentellen Spektrum sind in diesen Bereichen ebenfalls Banden zu erkennen, wenn auch mit deutlich geringerer Intensität. Zudem weisen alle berechneten Spektren eine starke Bande bei 1550 cm^{-1} auf, welche einer N-H Biegeschwingung, ebenfalls der Peptidbindung, entspricht. Im experimentellen Spektrum ist diese nicht zu finden, wobei anzumerken ist, dass diese aufgrund der Probleme bei der Akquirierung des Spektrums und der Bandenbreite eventuell nicht zu erkennen ist. Wenn diese im experimentellen Spektrum tatsächlich nicht vorhanden ist, deutet dies auf ein anderes Strukturmotiv der Peptidbindung hin (vgl. Schema 6). Um dies zu untersuchen, wurden auch Startstrukturen mit einem deprotonierten Stickstoff geprüft. Während der Optimierung dieser Strukturen wurde jedoch immer der Stickstoff protoniert. Die Bande im experimentellen Spektrum zwischen 1150 und 1300 cm^{-1} ist in keiner der berechneten Strukturen von **5** repräsentiert. In dieser Region sind C-O, P-OH und P=O-Streckschwingungen aktiv. In den berechneten Spektren sind diese Absorptionen blauverschoben und werden durch Gerüstschwingungen des HisHis überlagert. Eine Übereinstimmung der Bandenlage zwischen den berechneten Spektren und dem experimentellen Spektrum kann bei ca. 1100 cm^{-1} (N-H Imidazol *in plane* Biegeschwingung) und 1000 cm^{-1} (O-H *out of plane* Biegeschwingung) gefunden werden. Die Bande bei 910 cm^{-1} im experimentellen Spektrum wird nur im Spektrum von Konformer **a** wiedergefunden. Dabei handelt es sich um eine N-H Imidazol *out of plane* Schwingung. Die NH_2 Wiegeschwingung bei ca. 850 cm^{-1} werden durch die Konformere **b** und **c** gut abgebildet. Im Allgemeinen ist die Übereinstimmung zwischen den gerechneten Spektren und dem experimentellen Spektrum nicht überzeugend. Es stellt sich jedoch die Frage, ob dies an einer unvollständigen Konformationsanalyse, oder an der geringen Reproduzierbarkeit des experimentellen Spektrums liegt

4 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Dissertation wurden verschiedene Histidin Derivate in der Gasphase mittels einer Kombination aus Massenspektrometrie, IRMPD und computerchemischen Rechnungen untersucht und charakterisiert. Durch diese Kombination konnten erste Eindrücke in das Tautomere-Gleichgewicht von Ergothionein gewonnen werden und Unterschiede zwischen Gasphasen- bzw. Strukturen in Lösung ermittelt werden. Zudem wurde der Einfluss von Alkalimetallen auf die Konformation, sowie die unterschiedlichen Tautomere untersucht. Auch die Interaktion Histidin mit Nickel und Calcium wurde untersucht; sowie der Unterschied von Histidin Dimeren zu einem Histidin Dipeptid. Außerdem wurden erste Einblicke in die Veränderung der Konformation durch Phosphorylierung gewonnen.

Im ersten Teil der Arbeit wurden IR Ionen Spektren von Ergothionein als isoliertes Molekülion, sowie seines biologischen Vorläufers Hercynin und *N*-Methyl-Hercynin aufgenommen. Die Analytmoleküle wurden zudem mittels DFT Rechnungen untersucht und lineare IR Spektren dieser berechnet. Die IR Spektren wurden miteinander verglichen, um eine Identifikation der Tautomere und Konformere zu ermöglichen. Für ET weisen sowohl die Thiol als auch die Thion Spektren eine hohe Übereinstimmung mit dem experimentellen Spektrum auf.

Gasphase



Methanol

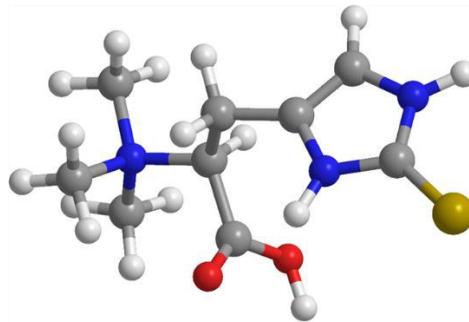


Abbildung 26. Grundstrukturen von ET in der Gasphase und in Methanol als Lösungsmittel. ¹¹

Dadurch wird eine eindeutige Zuweisung der dominanten Form verhindert. Weitere DFT Rechnungen zeigen allerdings, dass ET in Methanol eine Thion Struktur annimmt, welche in die Gasphase übertragen werden kann. Die Thion Struktur kann durch effektive Desolvatation kinetisch „eingefroren“, sodass eine Isomerisierung zum, in der Gasphase günstigeren, Thiol nicht erfolgt. Für Hercynin und *Nε*-Methyl-Hercynin wurde das gleiche Verhalten beobachtet. Im Gegensatz dazu steht das Verhalten der Analyten als Natrium-Addukte. Hier nehmen alle Analyten die durch Berechnungen vorhergesagten Grundstrukturen ein, welches spektroskopisch eindeutig nachgewiesen wurde. Für ET ist dies erneut die Thion Form.

Als nächstes wurden Histidin-Metall-Komplexe untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass ein Histidin nicht ausreichend ist, um Komplexe mit Metallen wie Nickel zu formen. Es wurde herausgefunden, dass zwei Histidin Reste jedoch genügen um ein Metall Kation zu komplexieren. Bei der Verwendung von Nickel als Kation, ist ein Histidin Rest am C-Terminus deprotoniert. Computerchemische Rechnungen zeigen, dass Nickel im Triplett-Zustand vorliegt. Es wurden drei mögliche ähnlich stabile Konformere mittels DFT identifiziert. Die linearen IR Spektren dieser drei Konformere passen zu dem IRMPD Spektrum des Komplexes. Es wird vermutet, dass alle drei Konformere gleichzeitig in der Gasphase vorliegen. Wenn Calcium im entsprechenden Komplex vorlag, war eine eindeutige Zuordnung einzelner, individueller

Isomere nicht möglich. In der Grundstruktur lag ein Histidin Rest als Zwitterion vor, was sich vom Nickel-Komplex deutlich unterscheidet. Zudem wurde das Calcium in der Grundstruktur nur durch fünf Koordinationsstellen komplexiert.

Wurden nun die separierten Histidin Reste als Peptid gekuppelt, ändern sich die Struktur motive drastisch. In dem Komplex zwischen Calcium und dem deprotonierten HisHis Dipeptid wurde eine charge solvation Struktur eingenommen. Dabei interagiert Calcium als schwach bindendes Hauptgruppen Metall mit dem Peptid Sauerstoff, sowie dem Sauerstoff des deprotonierten C-Terminus. Im Gegensatz dazu deprotoniert Nickel des Peptid-Stickstoff und induziert somit eine Iminolat Struktur. Computerchemische Berechnungen unterstützen diese beiden unterschiedlichen Bindungsmotive. Diese Ergebnisse können als Modelle für ein besseres Verständnis der Strukturen in Histidin reichen Domänen dienen, sowie in der Nickel Co-Faktor Chemie in der Enzymologie.

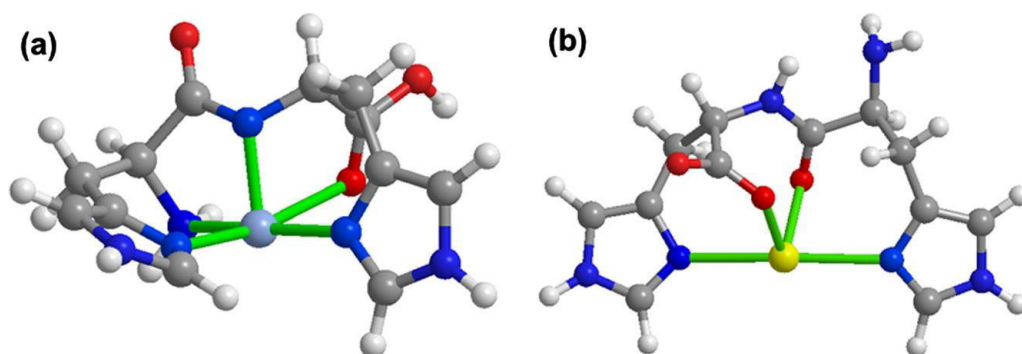


Abbildung 27. Grundstrukturen von $[\text{Ni}^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$ (a) und $[\text{Ca}^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$ (b). Zu erkennen sind die unterschiedlichen Bindungsmotive der Peptidbindung (Im vs. CS).¹⁰

Im letzten Teil der Dissertation ging es um die Phosphorylierung von Histidin als wichtige post-translationale Modifikation. Die Generierung von IRMPD Spektren gestaltete sich aufgrund der chemischen Instabilität der P-N Bindung schwierig. Die erhaltenen Spektren wurden mit berechneten linearen IR Spektren verglichen. Durch die Vielfalt möglicher Stellen der Phosphorylierung (C- oder N-terminaler Imidazol-Ring, $\text{N}\epsilon$ oder $\text{N}\delta$) und der Deprotonierung wurden verschiedene Rechnungen durchgeführt. Für pHis wurde festgestellt, dass die energetisch günstigste Stelle der Phosphorylierung $\text{N}\epsilon$ ist. Zudem

konnte festgestellt werden, dass durch die Phosphorylierung von Histidin ein Molekül ausreicht um einen pHis-Nickel-Komplex mit ausreichender Stabilität zu generieren. Das experimentelle IRMPD Spektrum des phosphorylierten HisHis-Dipeptides lag nicht in ausreichender Qualität vor um sichere Aussagen über die Konformation bzw. Änderung der Konformation durch die Phosphorylierung treffen zu können. Wurde Hercynin phosphoryliert, wurde eine Abweichung in der akkuraten Masse von ca. 26 mmu festgestellt. Diese Abweichung lässt daran zweifeln, dass es sich bei dem untersuchten Molekül tatsächlich um pHercynin handelt. Allerdings deutete die Fragmentierung während des IRMPD Experimentes darauf hin, dass pHercynin vorlag. Auch das so erhaltene Spektrum wies Ähnlichkeit mit den berechneten Spektren auf. Diese Ergebnisse bestätigten die bisherigen Studien, nach welchen die Phosphorylierung von Histidin und deren Untersuchungen nicht trivial sind.

Die vorliegende Arbeit zeigt deutlich die Stärken der Kombination von MS, IRMPD und DFT bei der Strukturaufklärung von Ionen in der Gasphase. Die Untersuchung weiterer kleiner Aminosäure-Sequenzen ist sinnvoll, um z.B. zu überprüfen, welchen Einfluss weitere Koordinationsstellen auf das Peptid-Bindungsmotiv haben. Zudem können pHistidin-Mimikri ¹³⁰ spektroskopisch untersucht werden, um die Instabilität zu umgehen. Des Weiteren können diese Studien auf kleine Moleküle welche wichtig für z.B. Organo-Katalyse sind ausgeweitet werden.

5 Experimenteller Teil

5.1 Synthese der Anaylten

L-Ergothionein wurde von der Firma Tetrahedron bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Hercynin und *Nε*-Methyl Hercynin wurden ausgehend von L-Hercynin (Acros Chemicals) nach einem bekannten Verfahren synthetisiert.¹³⁸

Die Histidin Metall Komplexe wurden nach einem leicht abgewandelten Standardverfahren synthetisiert.¹¹⁴

Die Histidin-Dipeptide (HisHis), welche als Histidinhistidyl-Liganden verwendet wurden, wurden von Dr. André Reinhard aus dem Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Neundorf (Universität zu Köln, Biochemie) synthetisiert und zur Verfügung gestellt.¹¹

Für weitere Versuche benötigtes HisHis wurde von *MSc Gabriel Hemmer* während seines E-Moduls hergestellt. Die Phosphorylierungen wurden nach einem abgewandelten Protokoll für Peptidsequenzen durchgeführt.¹³³

Im Folgenden soll auf die Synthesen genauer eingegangen werden.

5.1.1 L-Ergothionein

L-Ergothionein wurde von der Firma Tetrahedron, Frankreich bezogen und ohne Reinigung für die MS und FELIX Experimente verwendet. Für die Experimente wurde der Feststoff in MeOH/H₂O (v/v 1/1) gelöst.

HR-MS: [1+H]⁺ [C₉H₁₆O₂N₃S]⁺, ber.: 230.096 u, gef.: 230.096 u

[1+Na]⁺ [C₉H₁₅O₂N₃NaS]⁺, ber.: 252.078 u, gef.: 252.078 u

Bei der IRMPD erzeugte Produktionen der Vorläuferionen

[1+H]⁺ *m/z* 230 Produktionen: 60 (HNMe₃⁺), 90, 100, 127, 186

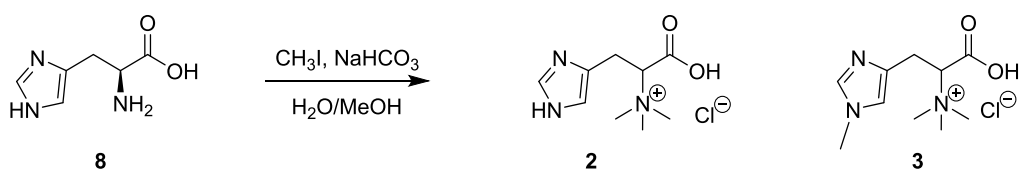
Neutralverlust: 170 Da, 131 Da (NMe₃, CO₂, C₂H₄),
 130 Da (CH₂NMe₃, CO₂, C₂H₄), 103 Da (NMe₃, CO₂),
 44 Da (CO₂)

[1+Na]⁺ *m/z* 252

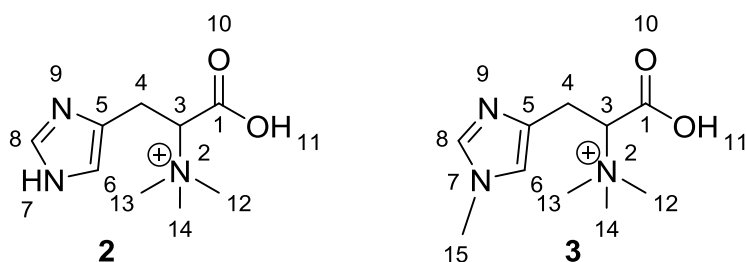
Produktionen: 99, 149, 165

Neutralverlust: 153 Da (NMe₃, CO₂, C₂H₄, Na⁺), 103 Da
 (NMe₃, CO₂), 87 Da

5.1.2 Darstellung von Hercynin und Nε-Methyl Hercynin



In einem 50 mL Rundkolben wurden 155 mg (1 mmol, 1 eq) L-Histidin (**4**), sowie 1 mL (16 mmol, 16 eq) Iodmethan und 1 g (12 mmol, 12 eq) Natriumhydrogencarbonat in 20 mL H₂O/MeOH (v/v 1/1) suspendiert. Der Kolben wurde in Alufolie gewickelt und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck entfernt. Der farblose Rückstand wurde in 5 mL Chloroform und 5 mL H₂O aufgenommen. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und das Volumen auf die Hälfte reduziert. Die trübe Lösung wurde mit 1 N HCl auf einen pH Wert von 2 eingestellt, wobei diese klar wurde. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, sodass 98 mg (0.4 mmol (bezogen auf **3**), 40%) eines gelben Feststoffes erhalten wurden. Für die ESI-MS und FELIX Experimente wurde 1 mg des Feststoffes in 1 mL H₂O/MeOH (v/v 1/1) gelöst und 1/1000 verdünnt.



¹H NMR: (600 MHz, D₂O, 298 K) δ [ppm] = 8.65 (s, 2H, C-8), 7.35, (s, 2H, C-6), 3.97 (m, 2H, C-3), 3.87-3.82 (3H, C-15), 3.5-3.48 (m, 4H, C-4), 3.4-3.29 (b, m, 18H, C-12, C-13, C-14),

¹³C NMR: (151 MHz, D₂O, 298 K) δ [ppm] = 169.6 (2C, C-1), 134.8 (2C, C-8), 126.97 (2C, C-5), 118.3 /2C, C-6), 77.5 (2C, C-3), 53.0 (6C, C-12, C-13, C-14), 23.2 (2C, C-4).

Die NMR-Spektren können dem elektronischen Anhang entnommen werden.

HR-MS: [2+H]⁺ [C₉H₁₆O₂N₃]⁺, ber.: 198.124 u, gef.: 198.124 u

[2+Na]⁺ [C₉H₁₅O₂N₃Na]⁺, ber.: 220.106 u, gef.: 220.106 u

[3+H]⁺ [C₁₀H₁₈O₂N₃]⁺, ber.: 212.139 u, gef.: 212.140 u, Δ +4.7 ppm

[3+Na]⁺ [C₁₀H₁₇O₂N₃Na]⁺, ber.: 234.121 u, gef.: 234.120 u, Δ -4.2 ppm

Bei der IRMPD erzeugte Produktionen der Vorläuferionen

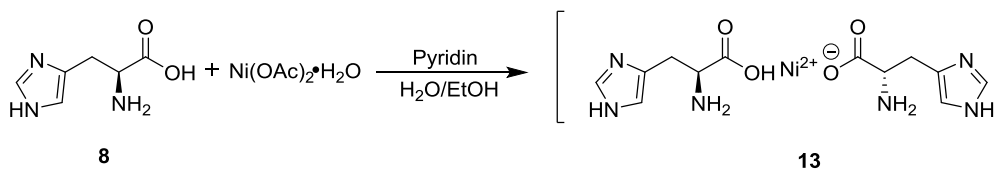
[2+H]⁺ *m/z* 198 Produktionen: *m/z* 60 (HNMe₃⁺), *m/z* 95, *m/z* 154
Neutralverluste: 138 Da, 103 Da (NMe₃, CO₂), 44 Da (CO₂)

[3N+H]⁺ *m/z* 212 Produktionen: *m/z* 153, *m/z* 168
Neutralverlust: 59 Da (NMe₃) 44 Da (CO₂)

[2+Na]⁺ *m/z* 220 Produktionen: *m/z* 117, *m/z* 133, *m/z* 161, *m/z* 176
Neutralverluste: 103 Da (NMe₃, CO₂), 87 Da, 59 Da, 44 Da (CO₂)

[3N+Na]⁺ *m/z* 234 Produktionen: *m/z* 131, *m/z* 147, *m/z* 160, *m/z* 175, *m/z* 190
Neutralverlust: 103 Da (NMe₃, CO₂), 87 Da, 74 Da (NMe₃, •CH₃), 59 Da (NMe₃), 44 Da (CO₂)

5.1.3 Darstellung des $[\text{Ni}^{2+}(\text{His})(\text{His-H})]^+$ Komplexes



Eine Lösung aus 45.6 mg (0.3 mmol, 3 eq) L-Histidin (**8**) und 8 mg (0.1 mmol, 1 eq) Pyridin in 6 mL H₂O wurden in einem Reagenzglas vorgelegt. 25 mg (0.1 mmol, 1 eq) Nickelacetat wurden in 3 mL Ethanol gelöst. Diese Lösung wurde vorsichtig auf die Lösung im Reagenzglas gegeben, sodass zwei Schichten entstanden. Nach 7 Tagen wurde eine violette Lösung erhalten. Für die ESI-MS und die FELIX Experimente wurde ein Aliquot dieser Lösung entnommen und mit H₂O verdünnt.

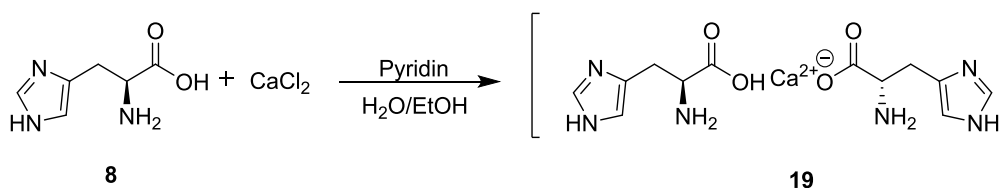
HR-MS: [**13**]⁺ [C₁₂H₁₇N₆O₄Ni]⁺, ber.: 367.066 u, gef.: 367.066 u

Bei der IRMPD erzeugte Produktionen der Vorläuferionen

[13]⁺ m/z 367 Produktionen: *m/z* 320, *m/z* 306, *m/z* 250, *m/z* 279, *m/z* 262, *m/z* 168

Neutralverlust: 44 Da (CO₂), 61 Da (CO₂, NH₃), 88 Da (2*CO₂), 117 Da (CO₂, C₂O₂NH₃), 105 Da (2*CO₂, NH₃), 199 Da (2*CO₂, NH₃, C₅N₂H₆)

5.1.4 Darstellung des $[\text{Ca}^{2+}(\text{His})(\text{His-H})]^+$ Komplexes



Eine Lösung aus 47.9 mg (0.31 mmol, 2.6 eq) L-Histidin (**8**) und 10.4 mg (0.13 mmol, 1 eq) Pyridin in 6 mL H₂O wurden in einem Reagenzglas vorgelegt. 13 mg (0.12 mmol, 1 eq) Calciumchlorid wurden in 3 mL Ethanol gelöst. Diese Lösung wurde vorsichtig auf die Lösung im Reagenzglas gegeben, sodass zwei

Schichten entstanden. Es nach 7 Tagen wurde eine klare Lösung erhalten. Für die ESI-MS und die FELIX Experimente wurde ein Aliquot dieser Lösung entnommen und mit H₂O verdünnt.

HR-MS: [19]⁺ [C₁₂H₁₇N₆O₄Ca]⁺, ber.: 349.093 u, gef.: 349.093 u

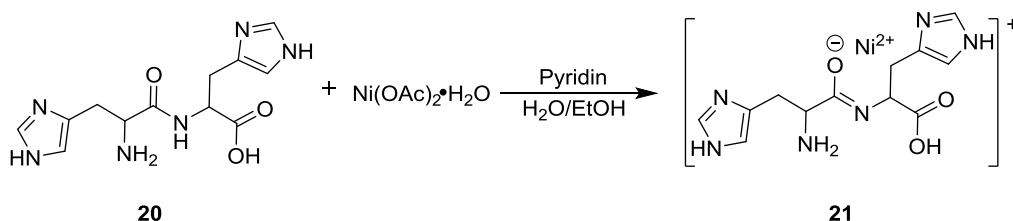
Bei der IRMPD erzeugte Produktionen der Vorläuferionen

[19]⁺ *m/z* 349

Produktionen: *m/z* 331, *m/z* 305, *m/z* 262, *m/z* 250,
m/z 230, *m/z* 212, *m/z* 194, *m/z* 168, *m/z* 156

Neutralverlust: 18 Da (H₂O), 44 Da (CO₂), 87 Da,
99 Da, 119 Da, 137 Da, 155 Da (Histidin), 181 Da,
193 Da

5.1.5 Darstellung des $[\text{Ni}^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$ Komplexes



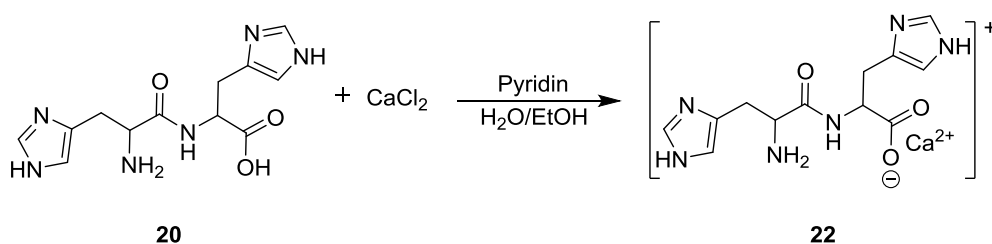
In 0.7 mL H_2O wurden 5 mg (0.02 mmol, 1 eq) **20** gelöst und in ein GC-Vial gegeben. 13 mg (0.05 mmol, 2.5 eq) Nickelacetat und 5.3 mg (0.07 mmol, 3.5eq) Pyridin wurden in 1.5 mL Ethanol gelöst und diese Lösung wurde vorsichtig über die Dipeptid-Lösung geschichtet. Es wurde eine klare Lösung erhalten, die ohne weitere Reinigung für die ESI-MS und FELIX Experimente verwendet wurde.

HR-MS: $[\mathbf{21}]^+$ $[\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_6\text{O}_3\text{Ni}]^+$, ber.: 349.055 u, gef.: 349.053 u, Δ -25.7 ppm

Bei der IRMPD erzeugte Produktionen der Vorläuferionen

$[\mathbf{21}]^+$ m/z 349 Produktionen: m/z 277, m/z 250
 Neutralverlust: 72 Da, 99 Da

5.1.6 Darstellung des $[\text{Ca}^{2+}(\text{HisHis-H})]^+$ Komplexes



In 0.7 mL H_2O wurden 4.5 mg (0.015 mmol, 1 eq) **20** gelöst und in ein GC-Vial gegeben. 9 mg (0.08 mmol, 5.3 eq) Calciumchlorid und 3.1 mg (0.04 mmol, 2.7 mmol) Pyridin wurden in 1.5 mL Ethanol gelöst und diese Lösung wurde vorsichtig über die Dipeptid-Lösung geschichtet. Es wurde eine klare Lösung erhalten, die ohne weitere Reinigung für die ESI-MS und FELIX Experimente verwendet wurde.

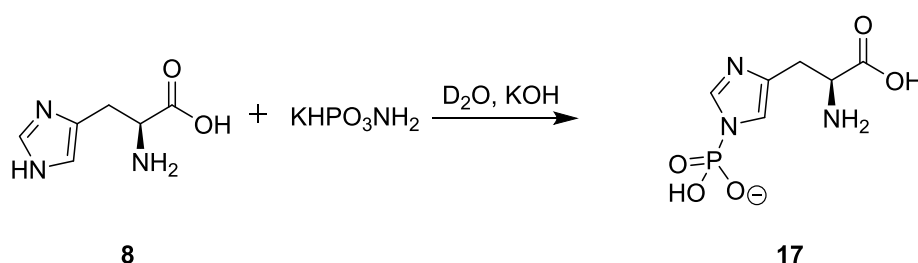
HR-MS: [22]⁺ [C₁₂H₁₅N₆O₃Ca]⁺, ber.: 331.083 u, gef.: 331.083 u

Bei der IRMPD erzeugte Produktionen der Vorläuferionen

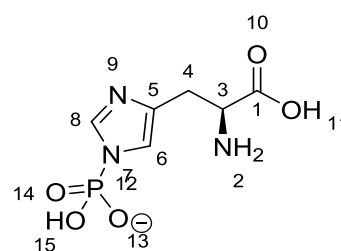
[22]⁺ *m/z* 331 Produktionen: *m/z* 309, *m/z* 287, *m/z* 271, *m/z* 254,
m/z 233, *m/z* 194, *m/z* 110
 Neutralverlust: 22 Da, 44 Da (CO₂), 59 Da, 76 Da.
 99 Da, 137 Da (N₃C₆H₇O), 110 Da

5.1.7 Darstellung von pHis

Die Synthese von **17** wurde von G. Hemmer Wie folgt durchgeführt:



Es wurden 50.4 mg (0.33 mmol, 1 eq) Histidin und 108 mg (0.81 mmol, 2.5 eq) Kaliumphosphoamidat in 3 mL D₂O gelöst und mit KOH auf PH 8 eingestellt. Die Lösung wurde über nach gerührt. Da die Lösung vor der Analytik nicht weiter gereinigt wurde, sollten im ³¹P-NMR zwei Phosphorsignale zu sehen sein. Eines vom Phosphoamidat und eines von **17**.



¹H-NMR: (AV 300, D₂O) δ [ppm]: 7.69 (s, 1H, H8); 6.99 (s, 1H, H6); 3.85 (m, 1H, H3); 3.02 (m, 2H, H4).

¹³C-NMR: (AV 300, D₂O) δ [ppm]: 174.44 (1C, C1); 134.54 (1C, C8); 118.42 (1C, C5); 54.60 (1C, C3); 28.64 (1C, C4).

³¹P-NMR: (AV 300, D₂O) δ [ppm]: -4.48 (s, 1P); -4.84 (s, 1P).

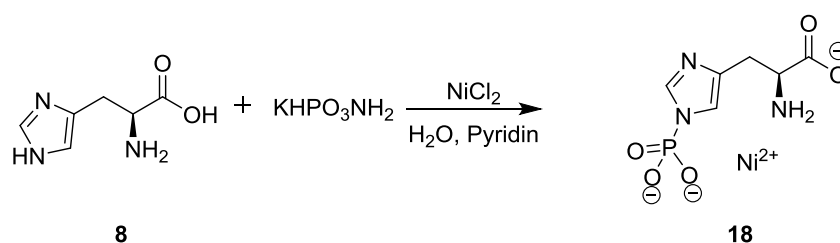
FT-IR: (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3245 (w), 2846 (m), 2611 (w), 2474 (w), 2175 (w), 2117 (w), 1620 (w), 1463 (m), 1298 (w), 1149 (s), 1116 (s), 1102 (s), 1072 (m), 985 (s), 870 (m), 759 (w), 737 (w), 676 (s).

HR-MS: [17]⁻ [C₆H₉O₅N₃P]⁻, ber.: 234.029 u, gef.: 234.029 u

Bei der IRMPD erzeugte Produktionen der Vorläuferionen

[17]⁻ *m/z* 234 Produktionen: *m/z* 216, *m/z* 190, *m/z* 97, *m/z* 79
 Neutralverlust: 18 Da (H₂O), 44 Da (CO₂), 137 Da,
 155 Da (Histidin)

5.1.8 Darstellung von pHis+Nickel



Es wurden 42.1 mg (0.27 mmol, 1 eq) L-Histidin, 100.7 mg (0.7 mmol, 2.6 eq) Phosphoramidat, 104.4 mg (0.8 mmol, 3 eq) Nickelchlorid und 30 mg (0.38 mmol, 1.4 eq) Pyridin in 1 mL H₂O suspendiert. Diese Lösung wurde verdünnt und für die ESI-MS und FELIX Experimente verwendet.

HR-MS: [18]⁻ [C₆H₇O₅N₃NiP]⁻, ber.: 289.948 u, gef.: 289.948 u

Bei der IRMPD erzeugte Produktionen der Vorläuferionen

[18]⁻ *m/z* 290 Produktionen: *m/z* 272, *m/z* 246, *m/z* 228, *m/z* 171
 Neutralverlust: 18 Da (H₂O), 44 Da (CO₂), 62 Da (H₂O,
 CO₂)

Multiplier Gain und der Orbitrap-Detektor mit der Thermo Fisher Pierce Kalibrierlösung kalibriert. Für den positiven Ionenmodus werden die Ionen von Coffein, MRFA und Ultramark 1621 verwendet und für den negativen Ionen Modus die Ionen von Natriumdodecylsulfat, Natriumtaurocholat und ebenfalls Ultramark 1621. Das von Thermo Fisher entwickelte Programm LTQ Tune Plus 2.5.5 wurde für die Datenaufzeichnung verwendet. Für die Prozessierung der erhaltenen Spektren sowie zur Berechnung der theoretischen Massen wurde Xcalibir 2.1.0, ebenfalls Thermo Fisher, verwendet. Die aufgenommenen Spektren entsprechen 30-100 Scans und wurden über diese gemittelt.

5.3 IRMPD-Experimente

Für die IRMPD Experimente wurde entweder ein 4.7 T FTICR Massenspektrometer oder ein modifiziertes 3D Quadrupol Massenspektrometer (Bruker Amazon Speed ETD) verwendet. Diese MS-Instrumente wurden mit einem freien Elektronen Laser gekoppelt. Die Experimente wurden an den FELIX Laboratorien der Radboud Universität in Nijmegen mit freundlicher Unterstützung von Dr. Giel Berden, Prof. Dr. Jos Oomens und Dr. Jonathan Martens durchgeführt.

5.3.1 FTICR

Ein 4.7 Tesla Fouriertransformations-Ionencyclotron-Massenspektrometer wurde mit einem Freie Elektronen Laser (FEL) gekoppelt. Dadurch können Infrarot Absorptionsspektren in der Gasphase durch IRMPD erhalten werden. Dieser Aufbau erlaubt eine einfache Bildung, Isolation, Speicherung und hohe Massenauflösung der Ionen. Der FELIX Strahl wird durch ein ZnSe-Fenster in die Vakuumkammer des MS eingebracht. Der Laser passiert die Ionenwolke durch in der ICR-Zelle angebrachte Kupferspiegel mehrfach um eine möglichst große Anzahl an Ionen anzuregen. Abbildung 28 zeigt den schematischen Aufbau des

verwendeten FTICR. Dort ist zu erkennen, wie die Ionen in der ICR-Zelle durch den IR-Strahl angeregt werden.

Die Ionen werden zwischen 1 und 3 Sekunden gespeichert, wobei sie mit 5-15 Makropulsen bei einer Rate von durchschnittlich 5 Hz bestrahlt werden.

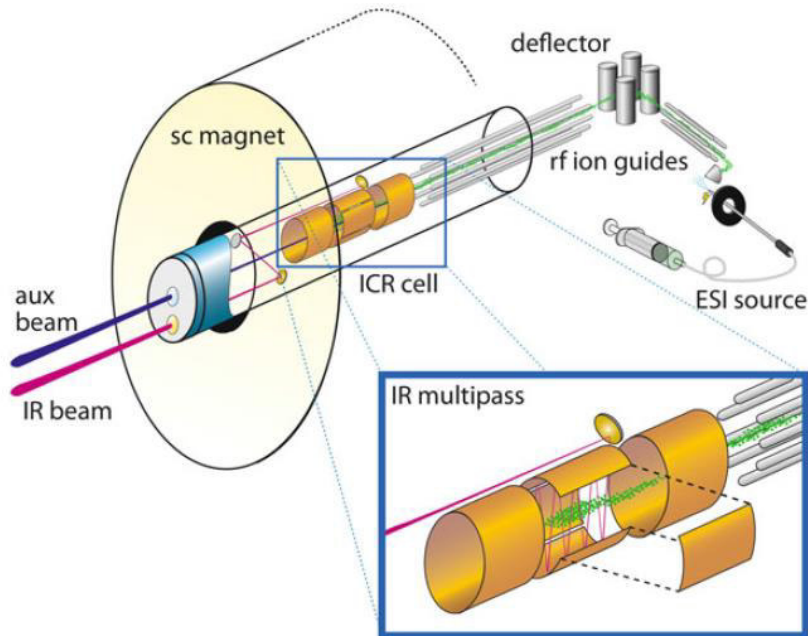


Abbildung 28. Schematischer Aufbau des verwendeten FTICR. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die Interaktion des IR-Strahls mit der Ionenwolke.¹³⁹

Die Ionen werden mittels ESI erzeugt. Dabei wird eine Micromass Z-Spray Quelle verwendet. Die Konzentrationen der Lösungen liegen bei ca. 10^{-3} M und die Flussraten bei $10 \mu\text{L}/\text{min}$. Die so erzeugten Ionen werden für 3 Sekunden in einem Hexapol akkumuliert bevor sie in die ICR-Zelle gelangen. Für die Selektion des gewünschten Vorläuferions aus der Analytlösung wird ein SWIFT (stored waveform inverse fourier transform) durchgeführt.⁹⁷

5.3.2 Quadrupol Ionenfalle

Wie auch schon beim FTICR werden die Ionen für die Experimente mit der 3D Quadrupol Ionenfalle (QIT) mittels ESI erzeugt. Die Konzentrationen sind jedoch mit ca. 10^{-6} M um Größenordnungen geringer. Auch die Flussraten der

Analytlösungen liegt nur bei 2-3 $\mu\text{L}/\text{min}$. Zudem wird für eine effektive Vernebelung Stickstoff als beheiztes Trocknungsgas eingesetzt. Da die Bruker Amazon Speed ETD nicht mit Laserdurchlässigen Fenstern ausgestattet ist und somit keinen optischen Zugang zur Ionenwolke bietet, musste diese dahingehend modifiziert werden. Dazu wurde ein Teil des Vakuumgehäuses durch ein optisches Experimentierbrett (Breadboard) ersetzt. Dieses wurde mit zwei IR transparenten Fenstern versehen. Die Ringelektrode wurde mit zwei 3 mm großen Löchern oben und unten versehen. Zudem sind zwei mit Gold beschichtete Spiegel unterhalb der Ionenfalle angebracht. Der Laserstrahl kann so die Ringelektrode passieren, dort die Ionen anregen und wird wieder aus dem Gehäuse geleitet. Durch die beiden Löcher in der Ringelektrode kann das Puffergas schneller aus der Falle entweichen, sodass größere Heliumströme notwendig sind. Der Helium-Druck beträgt in der Falle 10^{-3} mbar.¹² Die generierten Ionen werden typischerweise 0.05-50 ms akkumuliert. Die Synchronisierung zwischen Laser, MS und Aufzeichnung wird durch ein XML Scripting Interface¹⁴⁰, welches in die Bruker Ionenfallen Software eingearbeitet wurde, sowie eine zusätzliche Hilfsschnittstelle am MS geregelt.⁹⁸ Durch diese Modifikation kann sowohl Strahlung von einem FEL als auch von einem OPO Laser für die Experimente verwendet werden. Auch die Verwendung von beiden Laser Quellen zur gleichen Zeit für sogenannte „two color“ Experimente ist möglich.¹²

5.4 Computerchemische Berechnungen

5.4.1 Ergothionein und anverwandte Histidin Derivate

Alle Rechnungen dieser Studie wurden von Anthony Meijer, Universität Sheffield, durchgeführt. Die DFT Rechnungen für ET, Hercynin und *N* ϵ -Methyl-Hercynin wurden mit dem Programm Gaussian09, Version D.01, durchgeführt.¹⁴¹ Das Programm wurde dabei mit durch Gaussian kompatiblen Versionen von BLAS und ATLAS ergänzt.^{142,143} Für die Berechnungen wurde das

B3LYP Funktional mit GD3-BJ Korrektur-Term verwendet, welcher Dispersionsinteraktionen berücksichtigt. Die Verwendung des Korrektur-Terms ändert die Berechnungen aber nicht wesentlich.^{74,144} Als Basissatz wurde cc-pVTZ^{145,146} mit ultrafine settings für die Integrale verwendet. Die Strukturoptimierungen wurden ohne Symmetrie-Restriktionen durchgeführt. Die Übergangszustände wurden mittels des QST3-Algorithmus ermittelt.¹⁴⁷ Zusätzlich wurden Frequenz Rechnungen durchgeführt, um die Strukturen als lokale Minima oder Übergangszustände zu bestätigen. Die Grundstrukturen wurden durch die Abwesenheit von imaginären Frequenzen und die Übergangszustände durch genau eine imaginäre Frequenz identifiziert. Diese Kombination zeigt in früheren Arbeiten bereits eine gute Korrelation.¹² Die Berechnungen wurden *in vacuo* durchgeführt, soweit nicht anders angegeben. Für die Berechnungen von ET in MeOH wurde das PCM verwendet, wie es in Gaussian implementiert ist. Im Wellenzahlenbereich von 500-1900 cm⁻¹ wurden die Frequenzen mit einem Faktor von 0.97 und im Bereich von 3300-3600 cm⁻¹ mit einem Faktor vom 0.957 skaliert (vgl. Kapitel 1.2.2.1).^{10,148,149} Die berechneten Absorptionen wurden mit einer Gauss-Fit mit einer Breite von 12 cm⁻¹ bei der FWHM verbreitert. Zudem wurden die berechneten Schwingungen auf die Intensität der Carbonyl-Bande normiert. Die angegebenen Energiedifferenzen beziehen sich auf die freien Gibbs Energien bei 298K.

5.4.2 Nickel und Calcium Komplexe

Für die untersuchten Komplexe von Histidin und dem Dipeptid mit Nickel und Calcium wurden die gleichen Parameter wie im vorherigen Abschnitt verwendet. In allen Nickel Komplexen ist der energetisch günstigste Komplex ein Triplett. In den Calcium Komplexen liegt das Calcium als Singulett vor.

5.4.3 Phosphorylierte Molekül-Ionen

Für die phosphorylierten Histidine wurde eine Konformationsanalyse mit Maestro Materials Science 2.0.018 der Firma Schroedinger Inc. (Portland, OR) verwendet. Dabei wurde ein AMBER Kraftfeld verwendet. Für die Konformationsuche wurden die maximalen Schritte auf 1000 gesetzt. Das verwendete Energiefenster wurde auf 21 kJ/mol festgesetzt. Viele der so erzeugten Strukturen zeigen strukturelle Ähnlichkeiten, sodass diese zu einer Struktur zusammengefasst wurden und nur die Strukturen mit den niedrigsten Energien einer vollständigen Optimierung unterzogen wurden. Da Histidin, wie auch Hercynin zwei mögliche Phosphorylierungsstellen ($N\epsilon$ und $N\delta$ des Imidazol-Rings) anbietet, wurde für beide eine Konformationsanalyse durchgeführt. Für das Histidin Dipeptid waren vier mögliche Stellen vorhanden. Der C- bzw. -N-terminale Imidazol-Ring mit jeweils $N\epsilon$ und $N\delta$. Auch hier wurde für jede Möglichkeit eine Konformationsanalyse durchgeführt.

Die energetisch günstigsten gefunden Konformere und Isomere wurden mittels DFT weiter optimiert. Die Strukturen wurden mit dem B3LYP Funktional und dem cc-pVTZ Basissatz optimiert und gleichzeitig Frequenzrechnungen durchgeführt. Zur Berechnung der Energie wurden die so erhaltenen Minimumstrukturen einer Energieberechnung mit der gleichen Kombination aus Funktional und Basissatz unterzogen. Die Optimierung und Frequenzrechnungen wurden *in vacuo* durchgeführt. Die Energieberechnungen wurden bei einigen Strukturen zusätzlich in Methanol, mittels PCM durchgeführt, wie es in Gaussian implementiert ist.

6 Anhang

Die Koordinaten aller in dieser Arbeit abgebildeten Strukturen können dem elektronischen Anhang entnommen werden.

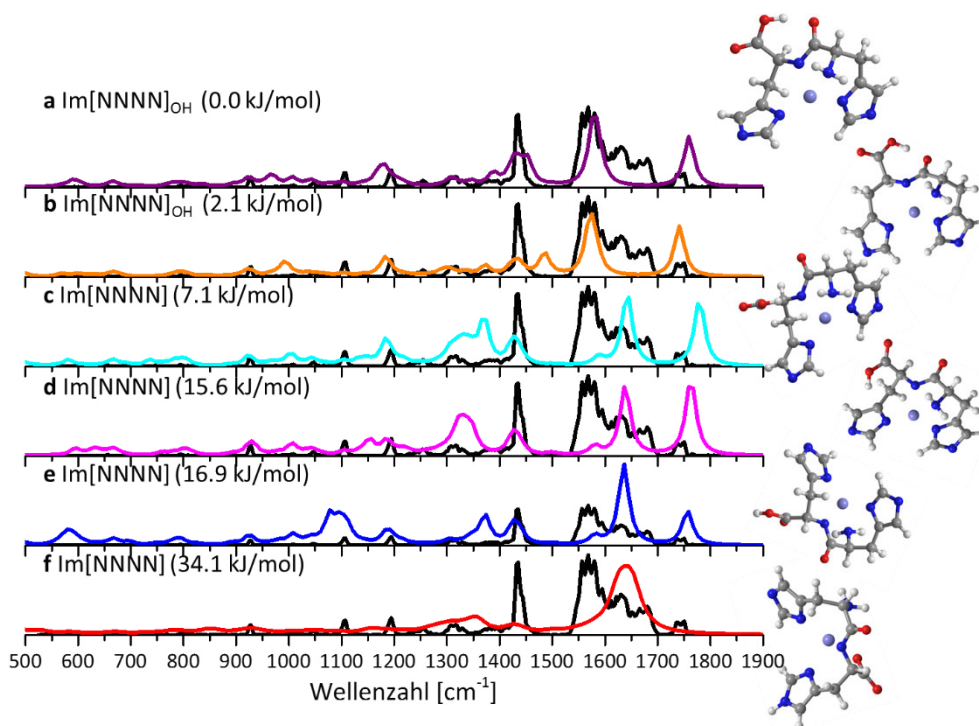


Abbildung 29. Sechs energetisch günstige Strukturen des [Ni²⁺(HisHis-3H)]⁻ mit *m/z* 347. Alle Strukturen weisen durch die dreifache Deprotonierung ein Iminol Strukturmotiv auf. Die Grundstruktur a weist zusätzlich eine Wasserstoffbrücke zwischen dem H des C-Terminus und dem Sauerstoff des Amides auf. Keine der berechneten Strukturen weist eine eindeutige Übereinstimmung mit dem experimentellen Spektrum auf.

Für die Generierung des FELIX Spektrums des Komplexes [Ni²⁺(HisHis-3H)]⁻ verwendete Ionen:

[21]⁻ *m/z* 347 Produktionen: *m/z* 330, *m/z* 301, *m/z* 284, *m/z* 254, *m/z* 219,
m/z 198, *m/z* 182, *m/z* 164
 Neutralverlust: 17 Da (NH₃), 36 Da, 63 Da, 93 Da, 128 Da,
 149 Da, 165 Da, 183 Da

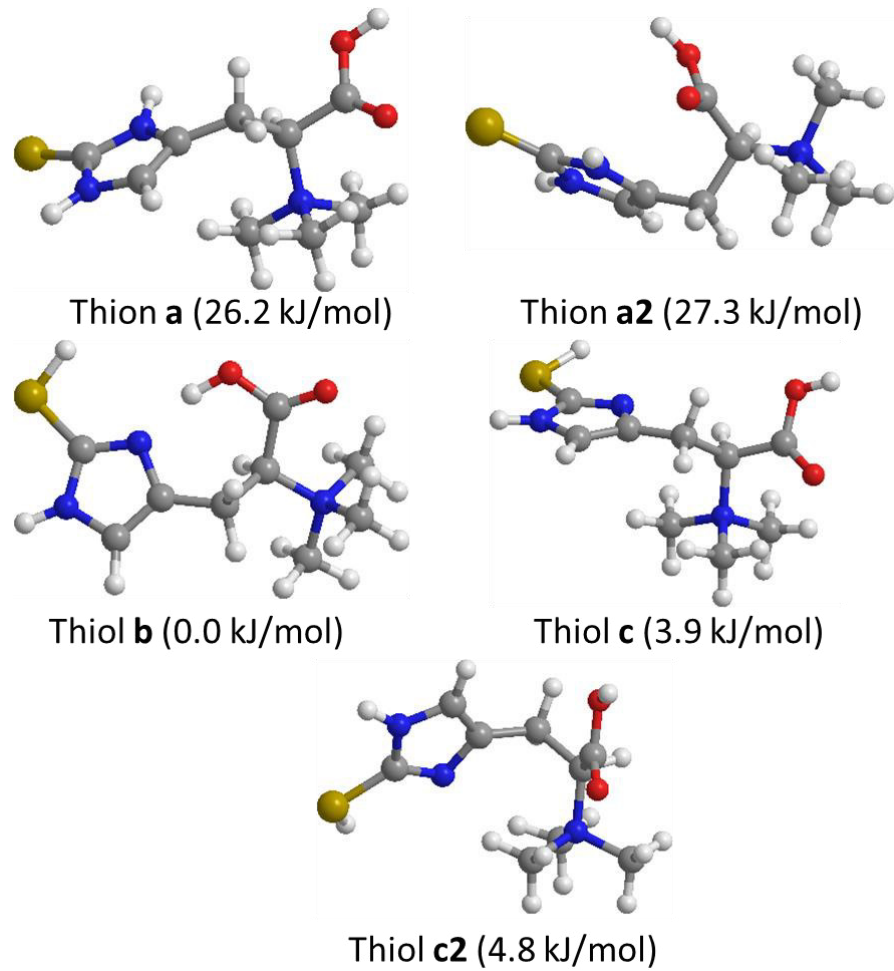


Abbildung 30. Die fünf in der Arbeit vorgestellten Strukturen von $[ET]^+$, B3LYP/cc-pVTZ, dispersion forces included: Grimme-3 mit Becke-Johnson Damping (gd3bj). Die Koordinaten können dem elektronischen Anhang entnommen werden.

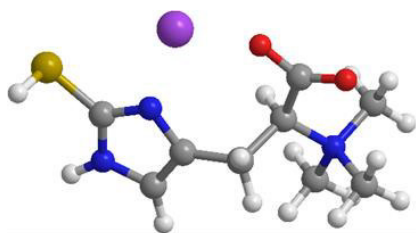
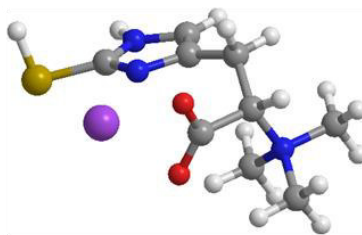
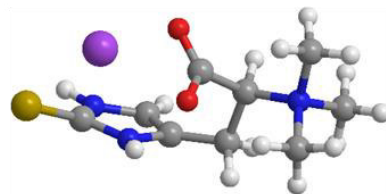
Thiol **a** (42.8 kJ/mol)Thiol **b** (19 kJ/mol)Thion **c** (0.0 kJ/mol)

Abbildung 31. Die drei in der Arbeit vorgestellten Strukturen von $[\text{ET}+\text{Na}]^+$, B3LYP/cc-pVTZ, dispersion forces included: Grimme-3 mit Becke-Johnson Damping (gd3bj). Die Koordinaten können dem elektronischen Anhang entnommen werden.

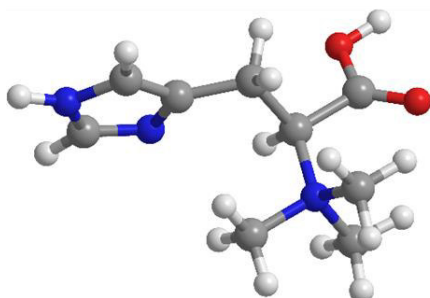
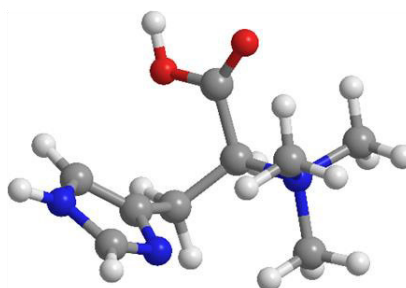
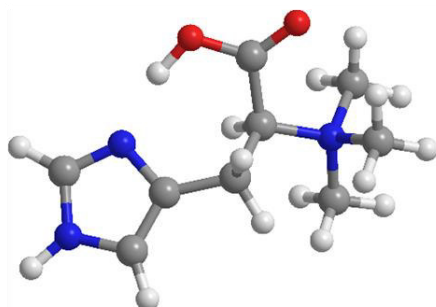
Konformer **a** (11.4 kJ/mol)Konformer **b** (7.4 kJ/mol)Konformer **c** (0.0 kJ/mol)

Abbildung 32. Die drei in der Arbeit vorgestellten Strukturen von $[\text{Hercynin}]^+$, B3LYP/cc-pVTZ, dispersion forces included: Grimme-3 mit Becke-Johnson Damping (gd3bj). Die Koordinaten können dem elektronischen Anhang entnommen werden.

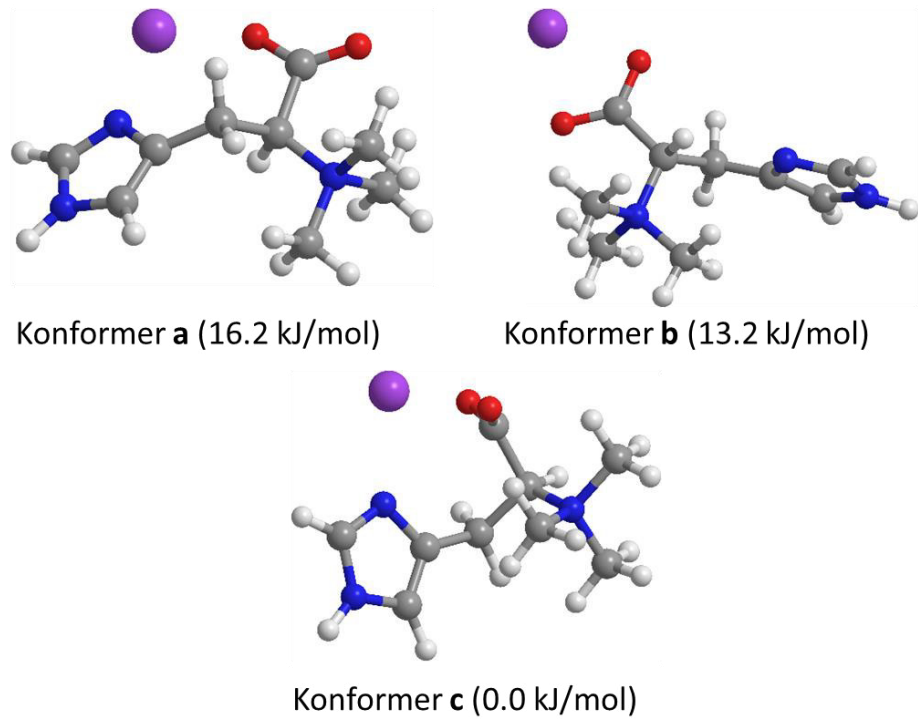


Abbildung 33. Die drei in der Arbeit vorgestellten Strukturen von $[\text{Hercynin-H+Na}]^+$, B3LYP/cc-pVTZ, dispersion forces included: Grimme-3 mit Becke-Johnson Damping (gd3bj). Die Koordinaten können dem elektronischen Anhang entnommen werden.

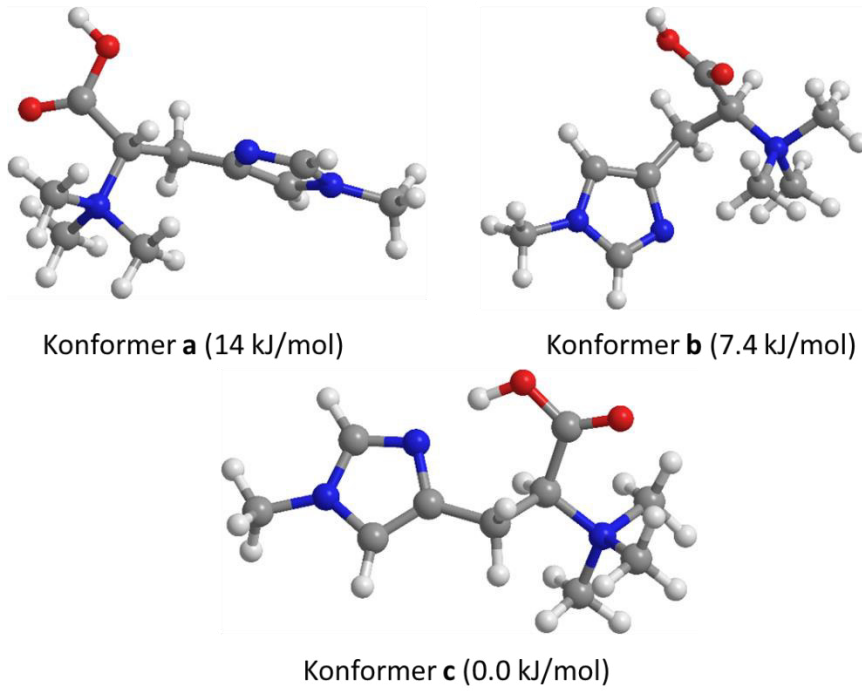


Abbildung 34. Die drei in der Arbeit vorgestellten Strukturen von $[N\epsilon\text{-Methyl-Hercynin}]^+$, B3LYP/cc-pVTZ, dispersion forces included: Grimme-3 mit Becke-Johnson Damping (gd3bj). Die Koordinaten können dem elektronischen Anhang entnommen werden.

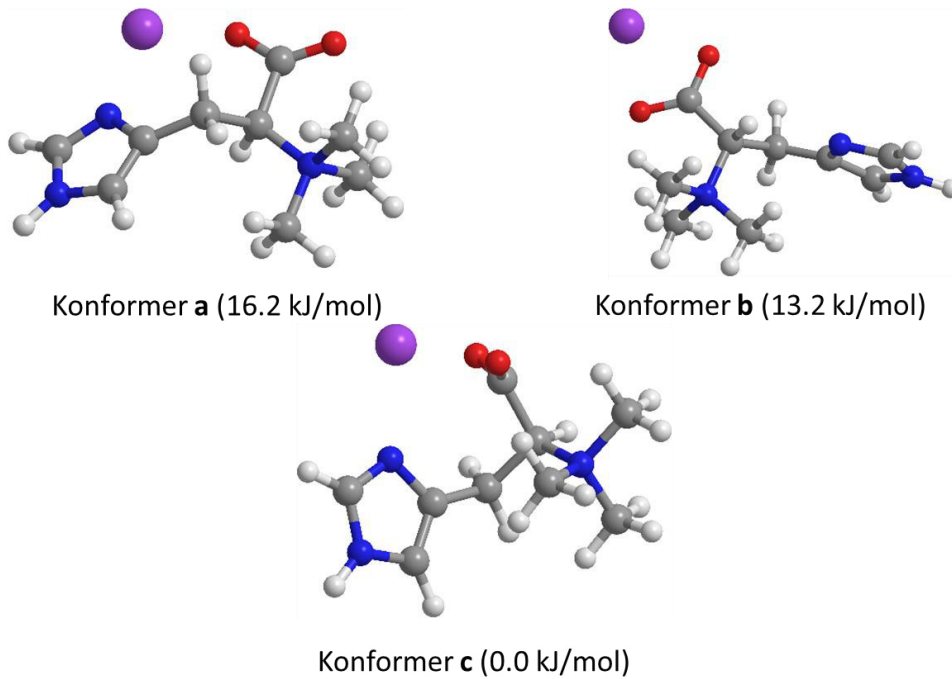
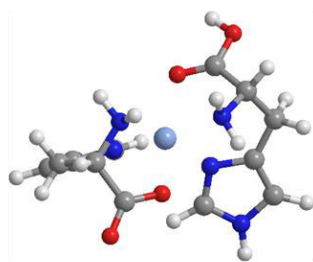
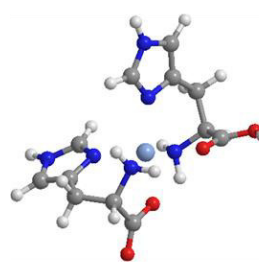


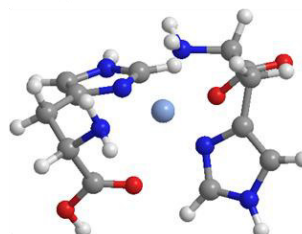
Abbildung 35. Die drei in der Arbeit vorgestellten Strukturen von $[N\epsilon\text{-Methyl-Hercynin+Na}]^+$, B3LYP/cc-pVTZ, dispersion forces included: Grimme-3 mit Becke-Johnson Damping (gd3bj). Die Koordinaten können dem elektronischen Anhang entnommen werden.



Konformer a (2.8 kJ/mol)

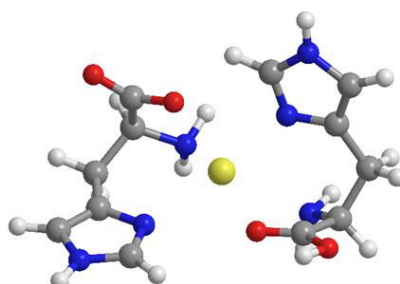


Konformer b (2 kJ/mol)

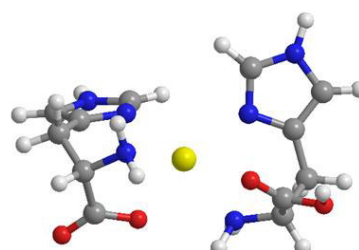


Konformer c (0.0 kJ/mol)

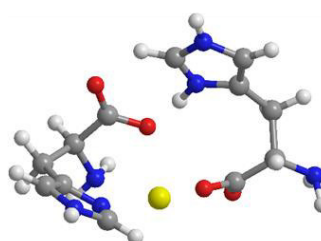
Abbildung 36. Die drei in der Arbeit vorgestellten Strukturen von $[\text{Ni}^{2+}(\text{His})(\text{His-H})^+]$, B3LYP/cc-pVTZ, dispersion forces included: Grimme-3 mit Becke-Johnson Damping (gd3bj), Nickel liegt im Triplett-Zustand vor. Die Koordinaten können dem elektronischen Anhang entnommen werden.



Konformer a (9.5 kJ/mol)



Konformer b (9.2 kJ/mol)



Konformer c (0.0 kJ/mol)

Abbildung 37. Die drei in der Arbeit vorgestellten Strukturen von $[\text{Ca}^{2+}(\text{His})(\text{His-H})^+]$, B3LYP/cc-pVTZ, dispersion forces included: Grimme-3 with Becke-Johnson Damping (gd3bj).

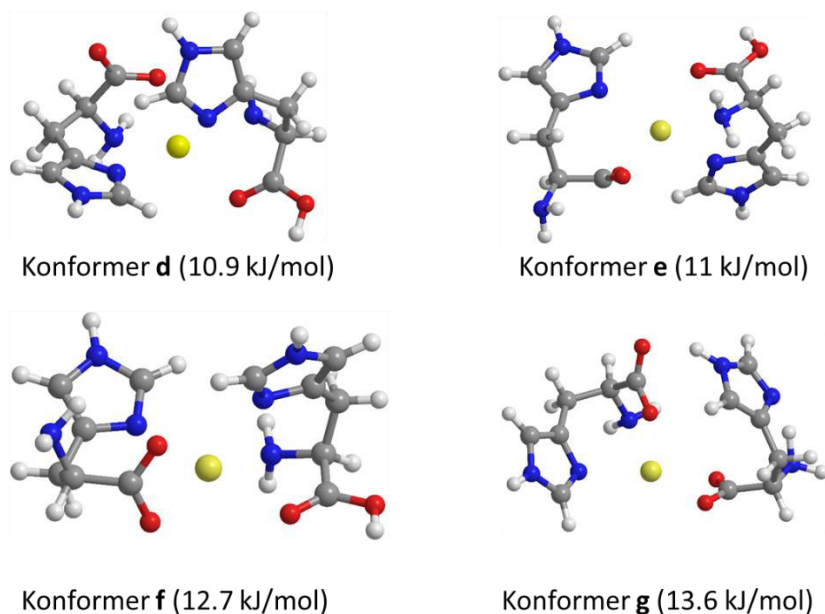


Abbildung 38. Weitere nicht in der Arbeit besprochene mögliche Strukturen von $[\text{Ca}^{2+}(\text{His})(\text{His-H})^+]$, B3LYP/cc-pVTZ, dispersion forces included: Grimme-3 mit Becke-Johnson Damping (gd3bj). Die Koordinaten können dem elektronischen Anhang entnommen werden.

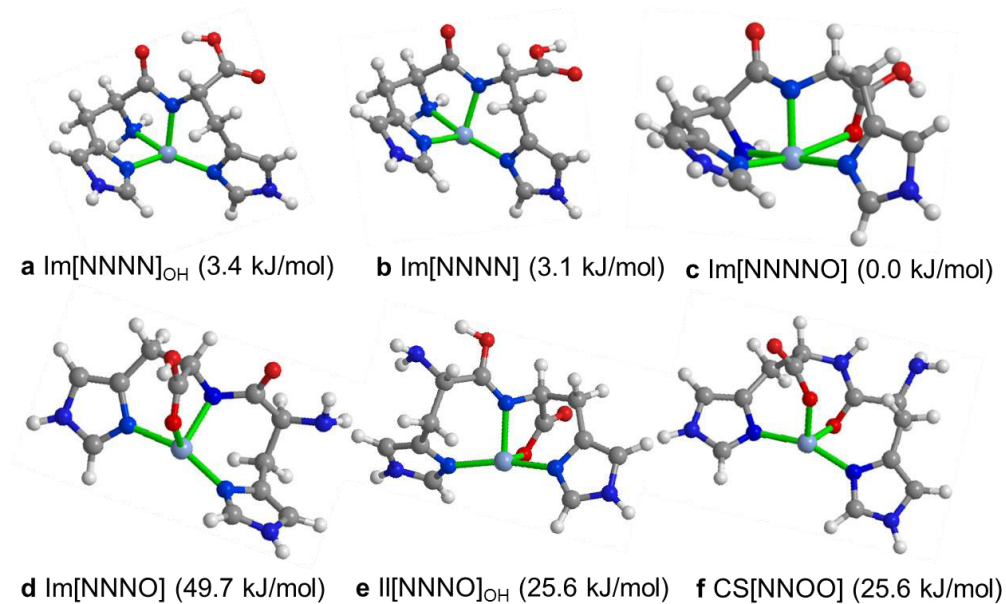


Abbildung 39. Die sechs in der Arbeit vorgestellten Strukturen von $[\text{Ni}^{2+}(\text{HisHis-H})^+]$, B3LYP/cc-pVTZ, dispersion forces included: Grimme-3 mit Becke-Johnson Damping (gd3bj), Nickel liegt im Triplett-Zustand vor. Die Koordinaten können dem elektronischen Anhang entnommen werden.

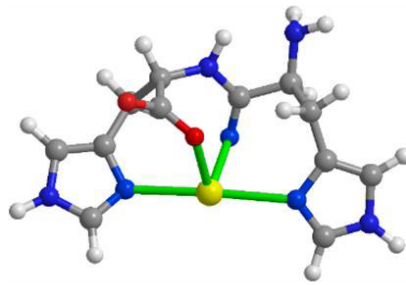
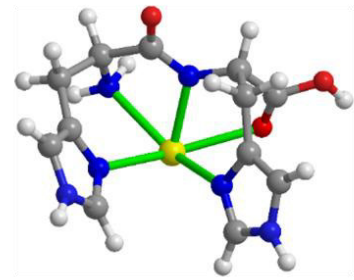
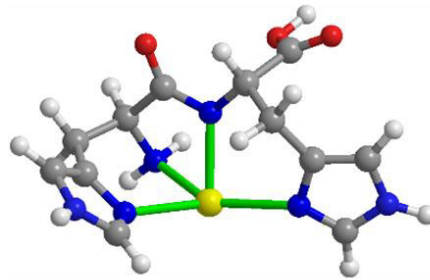
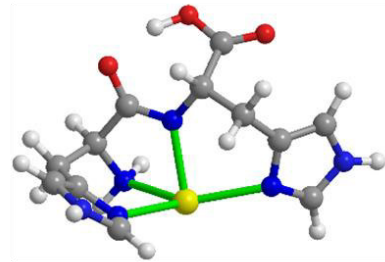
**a** CS[NNOO] (0.0 kJ/mol)**b** Im[NNNNO] (22 kJ/mol)**c** Im[NNNN] (58.9 kJ/mol)**d** Im[NNNN]_{OH} (53.6 kJ/mol)

Abbildung 40. Die vier in der Arbeit vorgestellten Strukturen von $[\text{Ca}^{2+}(\text{His})(\text{His-H})^+]$, B3LYP/cc-pVTZ, dispersion forces included: Grimme-3 mit Becke-Johnson Damping (gd3bj). Die Koordinaten können dem elektronischen Anhang entnommen werden.

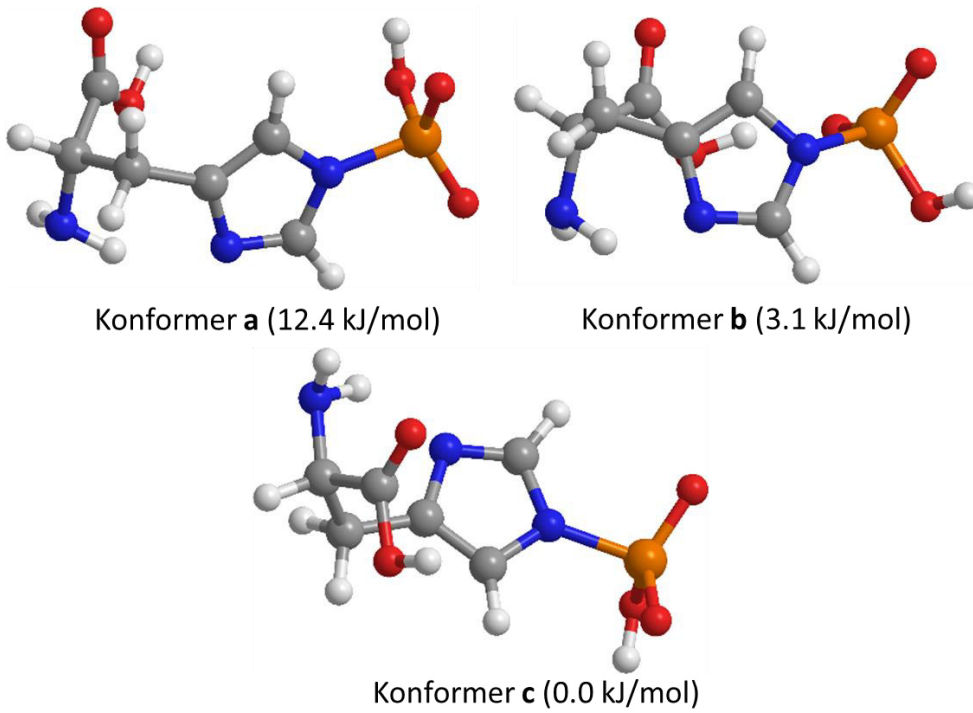


Abbildung 41. Die drei in der Arbeit vorgestellten Strukturen von [pHis]; B3LYP/cc-pVTZ, dispersion forces included: Grimme-3 mit Becke-Johnson Damping (gd3bj). Die Koordinaten können dem elektronischen Anhang entnommen werden.

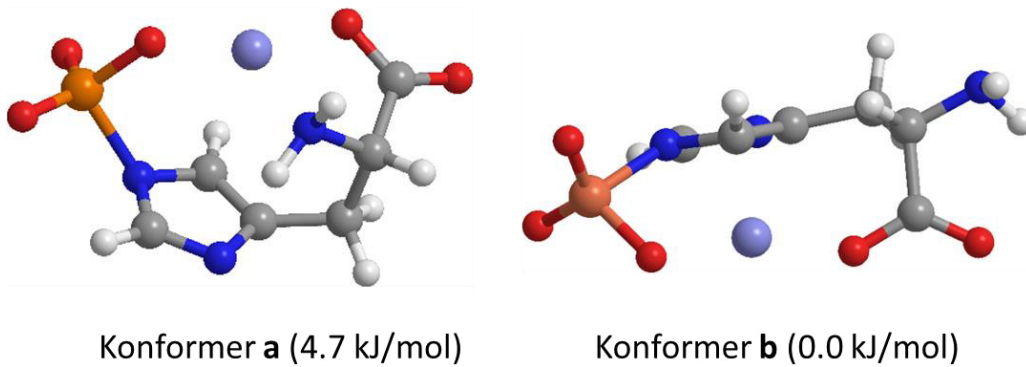
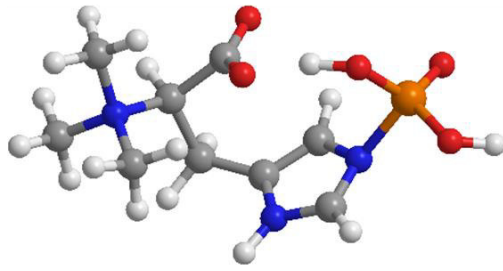
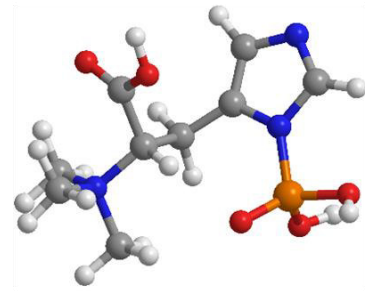


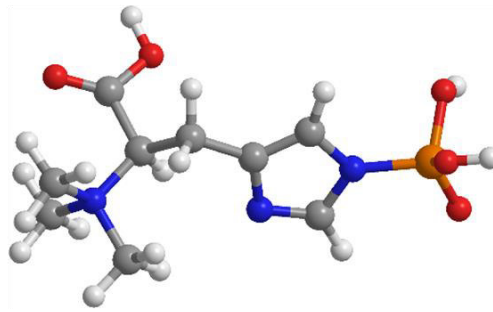
Abbildung 42. Die zwei in der Arbeit vorgestellten Strukturen von [pHis]; B3LYP/cc-pVTZ, dispersion forces included: Grimme-3 mit Becke-Johnson Damping (gd3bj), Nickel liegt im Triplett-Zustand vor. Die Koordinaten können dem elektronischen Anhang entnommen werden.



Konformer a (71 kJ/mol)



Konformer b (15.6 kJ/mol)



Konformer c (0.0 kJ/mol)

Abbildung 43. Die drei in der Arbeit vorgestellten Strukturen von [pHercynin]⁺, B3LYP/cc-pVTZ, dispersion forces included: Grimme-3 mit Becke-Johnson Damping (gd3bj), Nickel liegt im Triplett-Zustand vor. Die Koordinaten können dem elektronischen Anhang entnommen werden.

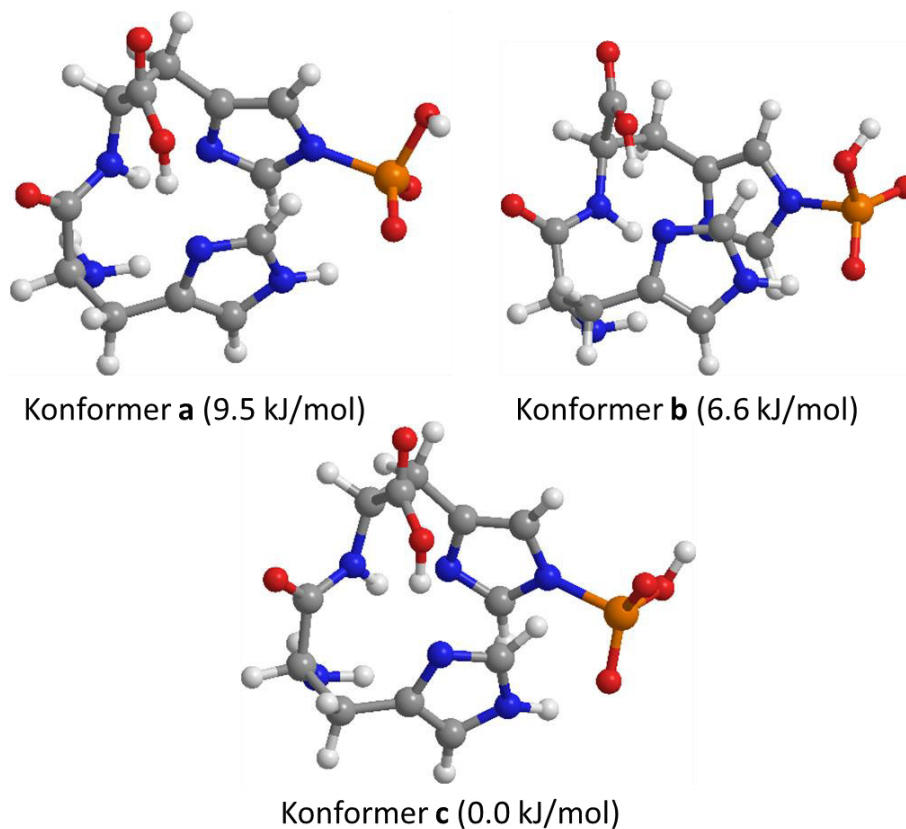


Abbildung 44. Die drei in der Arbeit vorgestellten Strukturen von [p(HisHis)]; B3LYP/cc-pVTZ, dispersion forces included: Grimme-3 mit Becke-Johnson Damping (gd3bj). Die Koordinaten können dem elektronischen Anhang entnommen werden.

Neben denen in dieser Arbeit vorgestellten Projekten, wurden zusätzliche Projekte von mir begleitet. Da aber weder die Synthesen noch die computerchemischen Berechnungen dazu von mir durchgeführt wurden, sind die bereits veröffentlichten Projekte als Artikel angehängt. Der Artikel wurde mit Genehmigung aus: *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139*, 5779-5786, reproduziert. Copyright 2018 American Chemical Society.

Hydrogen Tunneling above Room Temperature Evidenced by Infrared Ion Spectroscopy

Mathias Schäfer,^{*,†} Katrin Peckelsen,[†] Mathias Paul,[†] Jonathan Martens,^{‡,§} Jos Oomens,^{*,‡,§} Giel Berden,[‡] Albrecht Berkessel,^{*,†,¶} and Anthony J. H. M. Meijer^{*,||,¶}

[†]Department of Chemistry, Organic Chemistry, University of Cologne, Greinstraße 4, 50939 Cologne, Germany

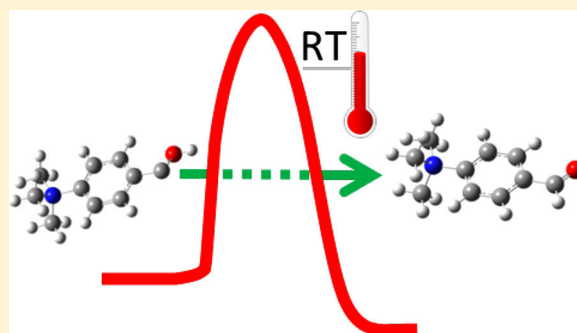
[‡]Radboud University, Institute for Molecules and Materials, FELIX Laboratory, Toernooiveld 7c, 6525 ED Nijmegen, The Netherlands

[§]Van't Hoff Institute for Molecular Sciences, University of Amsterdam, Science Park 904, 1098 XH Amsterdam, The Netherlands

^{||}Department of Chemistry, University of Sheffield, Sheffield S3 7HF, U.K.

S Supporting Information

ABSTRACT: While hydrogen tunneling at elevated temperatures has, for instance, often been postulated in biochemical processes, spectroscopic proof is thus far limited to cryogenic conditions, under which thermal reactivity is negligible. We report spectroscopic evidence for H-tunneling in the gas phase at temperatures around 320–350 K observed in the isomerization reaction of a hydroxycarbene into an aldehyde. The charge-tagged carbene was generated in situ in a tandem mass spectrometer by decarboxylation of oxo[4-(trimethylammonio)phenyl]acetic acid upon collision induced dissociation. All ion structures involved are characterized by infrared ion spectroscopy and quantum chemical calculations. The charge-tagged phenylhydroxycarbene undergoes a 1,2-H-shift to the corresponding aldehyde with a half-life of about 10 s, evidenced by isomer-selective two-color (IR-IR) spectroscopy. In contrast, the deuterated (OD) carbene analogue showed much reduced 1,2-D-shift reactivity with an estimated half-life of at least 200 s under the experimental conditions, and provides clear evidence for hydrogen atom tunneling in the H-isotopologue. This is the first spectroscopic confirmation of hydrogen atom tunneling governing 1,2-H-shift reactions at noncryogenic temperatures, which is of broad significance for a range of (bio)chemical processes, including enzymatic transformations and organocatalysis.



1. INTRODUCTION

Rates and selectivities of chemical reactions are classically defined by energy barriers, but can be significantly biased by quantum-mechanical tunneling.^{1,2} Indeed, hydrogen tunneling is known to play a crucial role in chemical reactivity at cryogenic temperatures, such as in astrochemistry, and at room temperature in biochemistry, organic chemistry, and catalysis. However, the effect of tunneling processes at room temperature are, until now, mainly recognized on the basis of kinetic isotopic effect measurements^{3,4} and direct spectroscopic proof for tunneling control of chemical reactions is thus far limited to cryogenic conditions, where thermal reactivity is negligible.^{5–10}

From 2008 onward, Schreiner and Allen et al. have demonstrated that α -ketocarboxylic acids such as glyoxylic acid, phenylglyoxylic and pyruvic acid, can be decarboxylated by flash-vacuum pyrolysis to form the respective hydroxycarbenes. Characterization of the trapped hydroxycarbenes by infrared (IR) spectroscopy in an argon matrix at 11 K,^{6–8} in combination with high-level computations, established that the isomerization of hydroxycarbenes to their respective aldehydes and enols, proceeds by a tunneling controlled 1,2-hydrogen shift reaction. This conclusion is consistent with the predominant formation of

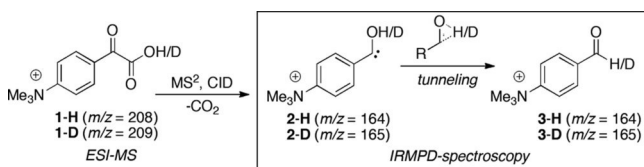
the thermodynamic product through hydrogen tunneling under the higher kinetic barrier at cryogenic temperatures.^{6–9}

In addition, O'Hair demonstrated in his extensive work on the fundamentals of the Pesci decarboxylation reaction¹¹ that charged carboxylate metal complexes expel neutral CO₂ to form metal-ion carbene complexes upon collision induced dissociation (CID) in the gas phase of a mass spectrometer (MS). The tandem MS experiments were conducted at room temperature in a linear quadrupole ion trap (QIT) with subsequent structure analysis of the organometallic ions by UV ion spectroscopy. Furthermore, this setup allows investigations of the intrinsic reactivity of the in situ formed analytes via ion–molecule reactions (IMR). To investigate the decarboxylation reaction of α -ketocarboxylic acids, which is of central importance for, e.g., thiamine dependent enzyme catalysis with pyruvate decarboxylases,¹² we synthesized a charge-tagged phenylglyoxylic acid derivative. As illustrated in Scheme 1, the fixed-charge α -ketocarboxylic acid precursor ions are transferred into the gas-phase by electrospray ionization (ESI) for analysis in a QIT mass spectrometer.¹³

Received: November 23, 2016

Published: March 10, 2017

Scheme 1. Gas-Phase Formation of a Hydroxycarbene from an α -Ketocarboxylic Acid Precursor in a QIT at Room Temperature



The molecular ions of oxo[4-(trimethylammonio)-phenyl]-acetic acid (1-H at m/z 208) and its monodeuterated derivative (1-D at m/z 209) are selected and dissociated by collisional activation. The loss of CO₂ via CID delivers a pair of isobaric product ions (2-H, 3-H at m/z 164 from precursor 1-H, and 2-D, 3-D at m/z 165 from 1-D, respectively) in a charge-remote fragmentation process.¹⁴ Samples of 4-(trimethylammonio)-benzaldehyde (3-H) and its isotopomer 3-D were also prepared and characterized spectroscopically as reference data sets for comparison (see SI for details). For the identification and characterization of individual isomers in a mixture of isobaric product ions, i.e., the charge-tagged hydroxycarbene 2-H and the respective aldehyde 3-H, and isotopologues 2-D and 3-D, we used infrared ion spectroscopy.¹⁵ Wavelength-tunable radiation from a free electron laser (FEL) and optical parametric oscillator (OPO) laser sources was used for the irradiation of ions stored in a spherical QIT mass spectrometer.¹³ As the density of ions stored in a QIT is far too low for direct IR absorption spectroscopy, the extent of precursor ion depletion and product ion formation is monitored as the energy of the photons used for activation is tuned (FEL: from 600 to 1800 cm⁻¹ and OPO: 2800–3700 cm⁻¹). In infrared multiple-photon dissociation (IRMPD) ion spectroscopy, the energy of tens to hundreds of resonantly absorbed photons is turned into vibrational excitation of all oscillators of the activated ion due to intramolecular vibrational redistribution (IVR), which ultimately leads to internal energies where one or more dissociation pathways become accessible. Infrared ion spectroscopy combined with a computational analysis of ion structures has proven to be a powerful analytical strategy to elucidate ion structures.¹⁵

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Characterization of Hydroxy[4-(trimethylammonio)phenyl]carbene (2-H) by Infrared Ion Spectroscopy and Theory.

Decarboxylation of 1-H/1-D can result in both 2-H/2-D and 3-H/3-D product ions (m/z 164/165) which have been characterized here by infrared ion spectroscopy.^{13,15} The infrared ion spectra of the isobaric product ions 2-H/3-H at m/z 164 (Figure 1a–c), and of 2-D/3-D at m/z 165 (Supplementary Figure S6a and S6c), result from the monitoring of the depletion of the respective precursor ion and their photofragment ions upon IRMPD. The predominant fragmentation process in all cases is the loss of a methyl radical, along with the loss of C₂H₄ and CH₄ and combinations of these (see Supplementary Table S3 for details). These results are presented in Figure 1 in which panel (a) displays the infrared spectrum (black) of product ions isolated at m/z 164 compared to the computed IR spectrum of the singlet *trans*-hydroxycarbene, 2-H_t (see Supplementary Figure S3 for comparison of the computed IR spectrum of the singlet *cis*-hydroxycarbene, 2-H_c). The presence of 2-H_t in the ion population at m/z 164 is immediately identified by the presence

of an OH stretching vibration, $\nu_{\text{O-H}}$ at 3553 cm⁻¹ and a C–O stretch mode $\nu_{\text{C-O}}$ at 1248 cm⁻¹, both matching the calculated bands for 2-H_t. In panel (b), the experimental (black) and calculated (red) IR spectra of the synthesized aldehyde 3-H model compound (4-(trimethylammonio)benzaldehyde) are presented, showing an absence of intensity in the region of 1250 cm⁻¹ and between 3500 and 3600 cm⁻¹ where the $\nu_{\text{O-H}}$ and $\nu_{\text{C-O}}$ resonances are found for the hydroxycarbene 2-H_t. As well, the characteristic aldehyde $\nu_{\text{C=O}}$ stretch for 3-H above 1700 cm⁻¹ in panel (b) identifies the corresponding band at the same position in the experimental spectrum in panel (a), unaccounted for the calculated IR spectrum of 2-H_t. This clearly indicates a mixture of 2-H_t and 3-H in the ion population at m/z 164 (see Supplementary Figure S4 for comparison with other constitutional isomers and Supplementary Table S1).⁸ A horizontal dashed line in panel (b) indicates a threshold below which IR resonances are of insufficient intensity to absorb the required number of photons to reach the dissociation limit of the molecule, so that these resonances remain unobserved in the experimental spectrum. While this threshold limits the number of bands observed experimentally for the aldehyde species (in both panels (b) and (c) of Figure 1), we see that this is not the case for the hydroxycarbene resonances in panel (a), where most of even the weakest bands still appear in the experimental spectrum. This apparent lower dissociation threshold of the hydroxycarbene 2-H_t is attributed to isomerization of the hydroxycarbene to the aldehyde during IR photodissociation measurements, where the energy released by isomerization assists the system in reaching its dissociation threshold (fewer photons must be absorbed). Panel (c) of Figure 1 presents an isomer-selective IR spectrum (green) of the aldehyde 3-H component of the ion population at m/z 164. This spectrum is generated in a novel two-color IR-IR approach. Here, the ion population at m/z 164 is first irradiated at 3553 cm⁻¹ using a 10W cw-OPO source. At this frequency only the hydroxycarbene isomer is resonant ($\nu_{\text{O-H}}$), but the aldehyde is transparent. Hence, we selectively photodissociate the hydroxycarbene 2-H_t ions in the population.⁸ In a second step, the remaining ions at m/z 164, those without a $\nu_{\text{O-H}}$ resonance at 3553 cm⁻¹, are reisolated and probed with tunable IR light to measure their infrared spectrum. The clear match between this isomer-selective IR spectrum and the reference spectrum measured for the 3-H model compound (black, panels (b) and (c) of Figure 1) confirms the assignment of 3-H as the only additional component besides 2-H_t of the ion population at m/z 164.

Panel (d) of Figure 1 presents a second two-color IR-IR experiment where the IR spectrum of the photofragment at m/z 149, generated selectively from the hydroxycarbene (orange), is presented (see Experimental Section for details). Similar to the two-color approach in panel (b), hydroxycarbene ions at m/z 164 are first selectively photodissociated by irradiation at 3553 cm⁻¹. However, in the second step, rather than reisolating the remaining ions at m/z 164, fragment ions at m/z 149 ([•]CH₃ loss) are isolated and probed using tunable IR light to generate their IR spectrum. The resulting spectrum features a sharp band at 1700 cm⁻¹, indicative of a $\nu_{\text{C=O}}$ stretch, strongly favoring the assignment of an aldehyde structure and not a hydroxycarbene structure. Additionally, the IR spectrum of the [•]CH₃ loss product (m/z 149) from the 3-H aldehyde model compound was measured (black) and matches very closely with the m/z 149 fragment generated selectively from the hydroxycarbene. Supplementary Figure S5 (Supporting Information) presents calculated spectra for the [•]CH₃ loss

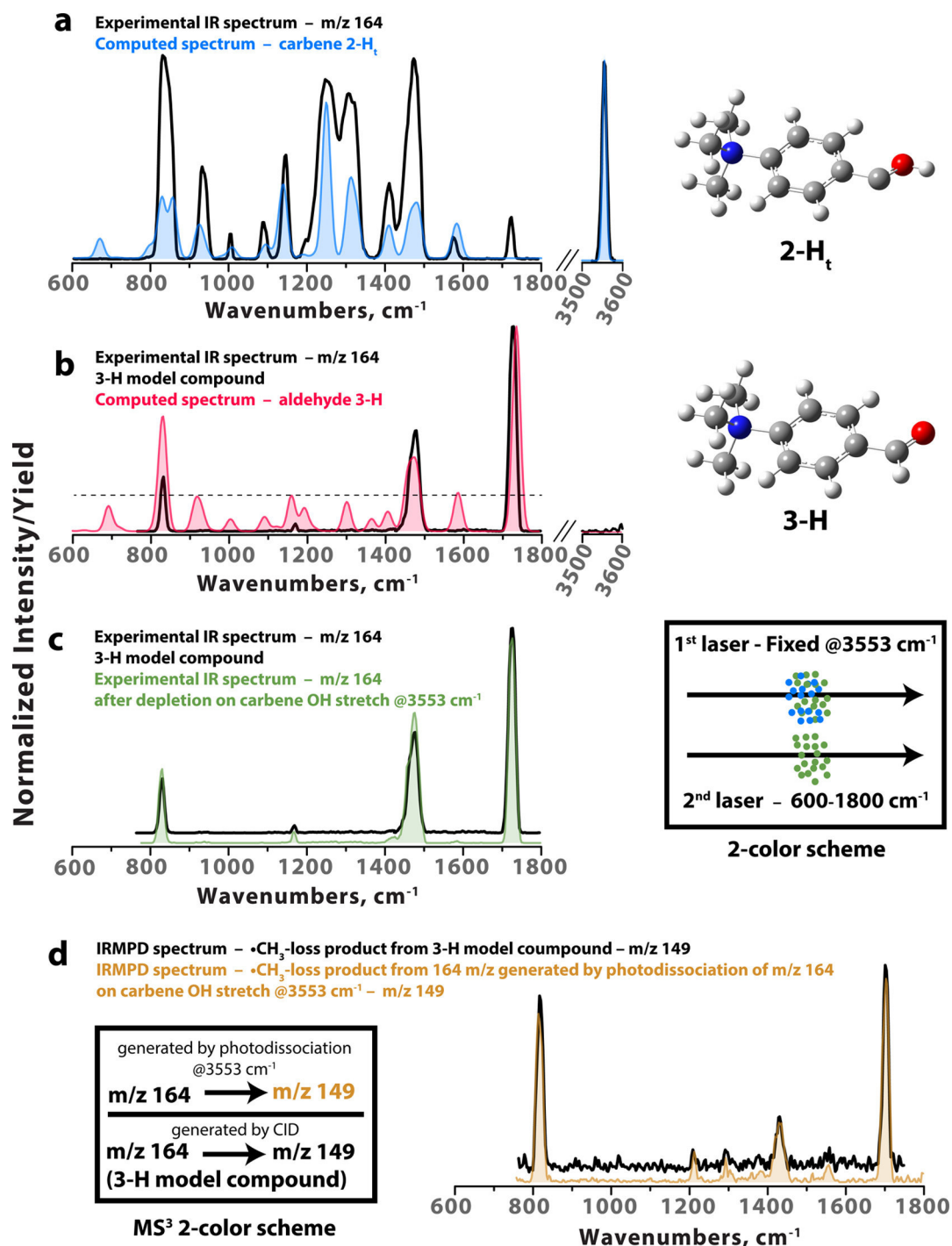


Figure 1. Experimental and calculated infrared spectra. (a) The experimental IR spectrum of the ion population at m/z 164 generated by CO_2 loss from 1-H (black; see Supplementary Table S3) is compared to the calculated IR spectrum of the charge-tagged *trans*-hydroxycarbene, 2- H_t (blue). (b) The experimental IR spectrum of the synthesized aldehyde (4-(trimethylammonio)benzaldehyde) model compound (black; see Supplementary Table S3) is compared with the calculated IR spectrum (red) for 3-H. (c) The experimental IR spectrum (green) of the remaining ions at m/z 164 in an isomer-selective two-color IR-IR experiment (see (c) inset) is compared to the experimental IR spectrum of reference compound 3-H. (d) The experimental IR spectrum of the $\cdot CH_3$ loss product (m/z 149) recorded after isomer-selective photodissociation of hydroxycarbene 2- H_t species is compared to the experimental IR spectrum of the CID generated $\cdot CH_3$ loss product (m/z 149) from the 3-H model compound. The structures of 2- H_t and 3-H shown in the right of panels (a) and (b) have been computed at the dispersion-corrected B3LYP-GD3BJ/cc-pVTZ level of theory. Frequencies are scaled by 0.97 (500–2000 cm^{-1})¹⁵ and by 0.95 (2800–3800 cm^{-1}).¹⁶

product from 2- H_t and 3-H, clearly demonstrating that the orange spectrum in panel (d) cannot be accounted for by a fragment ion with a hydroxycarbene structure (7- H_t), but matches well with the calculated IR spectrum of the corresponding, and energetically favored, aldehyde fragment (6-H).

These observations directly implicate isomerization of the hydroxycarbene 2- H_t to the aldehyde 3-H, during IR photodissociation. Our calculations also show that the energy needed to form 7- H_t from 2- H_t and to form 6-H from 3-H are 125.8 and 220.3 $kJ mol^{-1}$, respectively. These results are in

agreement with the higher stability for 3-H found in the experiment.

To further explore the energetics and pathways for the formation and reactions of the hydroxycarbene 2-H_t and the aldehyde 3-H, the zero-point corrected reaction energy profiles are presented in Figure 2 (the corresponding Gibbs energy

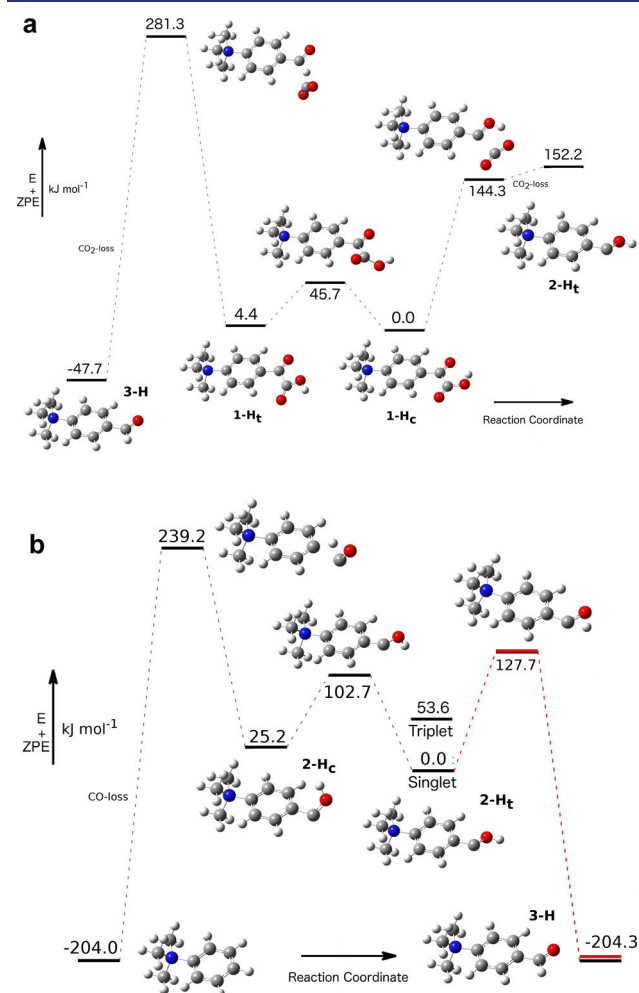


Figure 2. Reaction energy profiles. We have chosen to focus on single-molecule events here and are therefore plotting the internal energy. This allows for comparison with the internal energies used for the low temperature ($T = 10$ K) experiments of Schreiner et al.⁸ where all molecules will most likely be in a single quantum state.¹⁰ If we were to consider that in the trap the ions will be in a thermalized (above room temperature) distribution over quantum states before, during, and after the CID and IRMPD processes,^{18a,b} then the reaction profiles for the Gibbs energy from the SI are appropriate. (a) Formation of 2-H_t from 1-H_c and 3-H from 1-H_t. (b) Conversion of 2-H_t into 3-H as well as for the CO-loss reaction from 2-H_c, respectively. All structures have been calculated at the dispersion-corrected B3LYP-GD3BJ/cc-pVTZ level of theory. The red line indicates the corresponding zero-point corrected CCSD(T)-F12b energies. Reaction Gibbs free energy profiles are provided in Supplementary Figures S9 and S10.

reaction profiles are given in Supplementary Figures S9 and S10). Figure 2 matches closely to the zero-point corrected CCSD(T) energies calculated by Schreiner and Allen et al. for phenylhydroxycarbene in terms of relative energies, multiplicity and transition states⁸ and demonstrates that the charge-tag does not significantly influence the energy profiles for 2-H_t and 3-H.¹⁷ As well, CCSD(T)-F12b calculations (see SI for details)

on 2-H_t, 3-H and the barrier between them, as well as on the neutral analogues, confirm the validity of the DFT calculations (see also Supplementary Table S2). Panel (a) of Figure 2 furthermore shows that 1-H exists as two nearly isoenergetic conformers, 1-H_c (*cis*) and 1-H_t (*trans*), the latter of which is also found in the crystal structure of [4-(dimethylamino)phenyl]oxoacetic acid (S-2-H, see Supplementary Figures S11 and S12 for overlays of structures).

The energy profiles in Figure 2 indicate that the energy needed to form 2-H_t is significantly less than the energy barrier for forming the aldehyde 3-H (see Supplementary Table S2). Nevertheless, the aldehyde tautomer (3-H) is formed and experimentally identified as shown in Figure 1 and discussed above. While the initial formation of the hydroxycarbene product ion 2-H_t from precursor ion 1-H_t is clearly favored as shown in panel (a) of Figure 2, CID experiments do not exclude energetically demanding fragmentation channels, making the direct formation of the aldehyde 3-H possible.^{18a,19} Finally, the computed energetics in Figure 2 show that the formation of the triplet state of 2-H_t is thermodynamically unlikely, as its energy lies 53.6 kJ mol⁻¹ above the singlet ground state.⁸ Moreover, the process is kinetically inhibited due to the generally slow singlet to triplet intersystem crossing for molecules without heavy atoms. In line with this, no evidence of the hydroxycarbene triplet 2-H_t appears in the IR spectrum of the ions at m/z 164 (see Supplementary Figure S3). A similar argument holds for CO-loss from 2-H_c.

2.2. Isomerization Kinetics of Hydroxy[4-(trimethylammonio)phenyl]carbene (2-H/2-D) Measured by Isomer-Selective Infrared Ion Spectroscopy. Prior to the analysis of the isomerization kinetics, the deuterated isotopologue 1-D was decarboxylated upon CID and the resulting product ions at m/z 165 were subjected to IR ion spectroscopy. The respective IR spectrum is in convincing agreement with the computed one of 2-D, but also delivers evidence for the concomitant presence of the aldehyde tautomer 3-D on the basis of the clearly detected carbonyl stretching mode (see Supplementary Figure S6).

To investigate the time-dependence of the isomerization of the hydroxycarbenes 2-H_t and 2-D_t to their respective aldehydes 3-H and 3-D, IR photodissociation experiments were completed placing a delay (0–20 s) between generation of m/z 164/165 by CID and probing by IR photodissociation. Figure 3 displays the normalized photofragment signal vs the normalized precursor ion signal as a function of the delay. Using a wavelength of 1300 cm^{-1} , where 2-H_t and 2-D_t are both resonant, while cold 3-H and 3-D are transparent (see Figure 1 and Supplementary Figure S6), the isomerization of the hydroxycarbene species to aldehyde can be inferred from a decreasing photofragment signal with increasing delay. Panel (a) of Figure 3 shows that the maximum fragment ion signal from m/z 164 is indeed observed at $t = 0$ s and has almost completely decayed after 20 s, indicating a loss of resonance at 1300 cm^{-1} due to isomerization to the transparent aldehyde species. Conversely, under the same conditions, m/z 165 shows essentially no decay in fragmentation signal over the full range of 20 s, indicating that no isomerization takes place and m/z 165 remains resonant with photons at 1300 cm^{-1} .

Together with the identification of the aldehyde 3-H structure (see Figure 1, above) as the minor component of the ion population at m/z 164 (see Figure 3a at 0s), these results show that the decay of 2-H_t is accompanied by the progressive formation of aldehyde 3-H. This isomerization reaction of 2-H_t

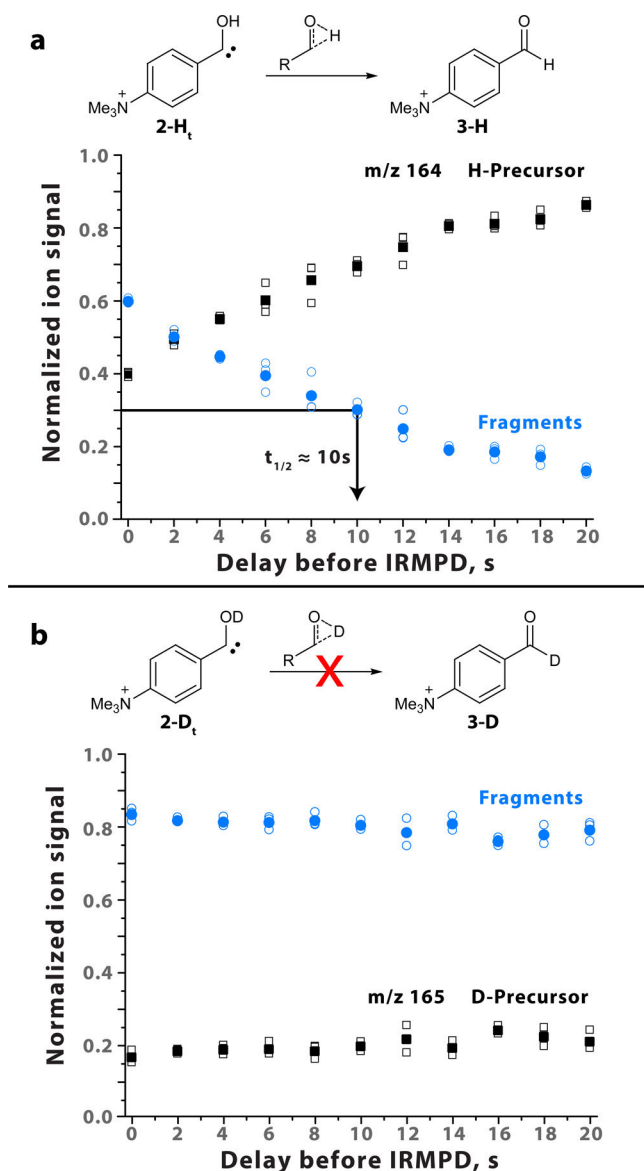


Figure 3. Time-dependent IRMPD measurements of deuterated and nondeuterated m/z 164/165 ions. Hydroxycarbene-selective photodissociation yields were measured at 1300 cm^{-1} where hydroxycarbene species are resonant and give fragmentation, and aldehyde species are transparent and not detected. Black squares represent the normalized precursor ion signal and blue circles represent the sum of the normalized fragment signals, which are shown in [Supplementary Table S3](#) (IR yield). Three measurements were taken at each delay time (open symbols) and are averaged (closed symbols).

to **3-H** and the absence of the corresponding isomerization of **2-D_t** to **3-D** represents a direct observation of hydrogen tunneling at room temperature and above.

Reaction mechanisms that do not involve tunneling imply small primary kinetic isotope effects (KIEs) for reactions where the hydrogen transfer proceeds via a nonlinear TS, a criterion that clearly applies to the 1,2-H-shift in **2-H_t**, as [Scheme 1](#) and [Figures 2](#) and [3](#) illustrate.²⁰ In contrast, large primary kinetic isotope effects ($\text{KIE}_{\text{H/D}} = k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$) are found when tunneling is involved ($\text{KIE} > 6.4$ at 300 K)^{3,4,21} and competitive reaction isotope effects can be excluded.²²

Isomerization of hydroxycarbene **2-H_t** to aldehyde **3-H** occurs with a $t_{1/2}$ of approximately 10 s. In the case of the 1,2-D-shift in **2-D_t**, k_{D} is close to zero as the deuterated hydroxycarbene

2-D_t does not appreciably isomerize over the time frame of the experiments (20 s), indicating a major primary KIE. A quantitative analysis of the data is presented in [Supplementary Figures S7](#) and [S8](#) and suggests a $\text{KIE} > 20$. If **2-H_t** were to isomerize to **3-H** without involving tunneling, the Eyring equation shows that the KIE should be approximately 1.2 at 298 K based on the calculated Gibbs free energies of activation for **2-H_t** and **2-D_t**. We note that the substantially shorter half-life of about 9.5 ± 0.3 s in our experiments above room temperature (see [Supplementary Figure S7](#)), compared to 2.5 h at 11 K determined by Schreiner et al.^{8,23} for phenylhydroxycarbene, suggests a reduced effective barrier width for the isomerization. This must be due to the elevated temperature, given that the computed barriers for the neutral phenylhydroxycarbene and the charge tagged derivative investigated here are similar. The elevated temperature (and associated vibrational excitation) means that the height of the barrier is smaller relative to the internal energy of the molecule and that the barrier is narrower (see [Supplementary Figure S13](#)).⁸ In addition, lower-energy vibrational modes will be more extensively populated in our experiment compared to the one by Schreiner. Taken together, this may lead to a lower barrier due to geometric and/or electronic changes in the molecule, whereby the anharmonicity of those low-energy vibrations is likely to play a role as well.

On the basis of the large KIE observed for the gas-phase isomerization reaction of **2-H_t** to **3-H**, we conclude that the 1,2-H shift reaction of the hydroxycarbene **2-H_t** probed at temperatures above RT can dominantly be attributed to hydrogen tunneling.^{3,24} It shall finally be mentioned that studies of Gronert²⁴ and O'Hair²⁵ suggest that ions stored in spherical QITs at RT at a He pressure of about $\sim 10^{-3}$ mbar, are quickly (in milliseconds)²⁶ and effectively cooled by numerous collisions with the He buffer gas, and ultimately thermalize to an effective temperature of about 320–350 K.^{18a,b,24,25} At a T_{eff} of 350 K thermal isomerization is virtually impossible for **2-H_t**, due to the substantial energy barrier of about 128 kJ mol^{-1} , providing further support for the assumption that the observed isomerization of hydroxycarbene **2-H_t** to **3-H** proceeds via hydrogen tunneling.

3. CONCLUSIONS

In summary, we present the first *spectroscopic* evidence for hydrogen tunneling at temperatures above 300 K using two-color tautomer selective vibrational spectroscopy of gaseous, isolated molecular ions. A charge-tagged phenylhydroxycarbene was generated by the decarboxylation of oxo[4-(trimethylammonio)-phenyl]acetic acid in an ion trap mass spectrometer and its structure and reactivity probed by infrared ion spectroscopy using an infrared free electron laser (FELIX) in combination with quantum chemical modeling.¹⁵ The hydroxycarbene undergoes 1,2-H-shift to its corresponding aldehyde, which can be clearly distinguished by isomer-selective two-color infrared-infrared depletion experiments. The deuterated carbene analogue shows negligible 1,2-D-shift reactivity, providing clear evidence that the hydrogen atom rearrangement proceeds via tunneling. This observation is the first spectroscopic confirmation of hydrogen tunneling at noncryogenic temperatures and provides a firm basis for the interpretation of tunneling-controlled processes such as enzymatic reactivity^{3–5} and organocatalysis.^{27–29} Additionally, these results open up new avenues for further investigation of the intrinsic reactivity of hydroxycarbenes at room temperature in ion trap mass spectrometers via ion molecule reactions.^{11,30}

4. EXPERIMENTAL SECTION

4.1. Mass Spectrometry. The compounds 1-H, 1-D, 3-H and 3-D were freshly synthesized for this study (see Supporting Information for details) and characterized by positive ion mode electrospray ionization mass spectrometry ((+)ESI-MS).^{18b} Compounds 1-H and 3-H were dissolved ($c \sim 10^{-5}$ M) in CH₃OH, compounds 1-D, 3-D were analyzed in CD₃OD/CH₃OH. All (+)ESI-MS and MS² experiments as well as accurate ion mass measurements were conducted on an LTQ-Orbitrap XL instrument (ThermoFisher, Bremen Germany); see Supplementary Figures S1 and S2. Product ion spectra were acquired in the linear ion trap (LTQ) part of the LTQ-Orbitrap instrument by CID with the He bath gas present ($P = 2 \times 10^{-5}$ Torr) and the product ions were analyzed in the orbitrap (see Supplementary Figure S2). Accurate ion masses were determined in the orbitrap analyzer with a resolution of 30000 fwhm with external calibration ($\Delta m < 3$ ppm) or with addition of internal standards ($\Delta m < 2$ ppm). Typical (+)ESI-MS conditions: Flow rate: 5 $\mu\text{L min}^{-1}$; Capillary voltage: 3.20 kV; Sheath gas: 4.99 [arb. units]; Aux gas: 2.00 [arb. units]; Resolution: 30000 fwhm.

4.2. Infrared Ion Spectroscopy. A modified spherical 3D quadrupole ion trap mass spectrometer (Bruker, Amazon Speed ETD) was used for the infrared ion spectroscopy experiments and has been described in detail elsewhere.¹³ The 3D quadrupole ion trap was operated at ambient temperature (~ 320 K) with a He pressure in the trap of $\sim 10^{-3}$ mbar to ensure optimal performance (e.g., effective collisional cooling, signal-to-noise ratio, sensitivity etc.).¹³ Tunable radiation for the photodissociation experiments was generated by the Free Electron Laser for Infrared eXperiments (FELIX)^{13,15,16} in the 600–1800 cm^{-1} range and a pulsed OPO (LaserVision, USA) source in the 2800–3700 cm^{-1} range both operating at a repetition frequency of 10 Hz. Pulse energies were approximately 20–50 mJ per 5 μs long macropulse for the FEL and 10–20 mJ per 5 ns long pulse for the OPO. The full width at half-maximum bandwidth of the FEL is approximately 0.4% of the central wavelength and 3 cm^{-1} for the OPO. Precursor ions were formed by electrospray ionization from solutions of 0.5 μM in methanol at a flow rate of 120 $\mu\text{L h}^{-1}$. Ions were irradiated for 1 s, corresponding to interaction with 10 laser pulses. The IR spectra were constructed from a series of mass spectra recorded with the laser scanning over the frequency range from 600–1800 cm^{-1} , monitoring the intensity of the IR-induced product ions (primarily methyl radical loss) and the depletion of the precursor ion as a function of IR frequency. Unimolecular dissociation results from the absorption of multiple IR photons (IRMPD). The IR yield ($\sum I_{\text{fragment ions}} / \sum I_{\text{all ions}}$) was determined after laser irradiation at each frequency and was linearly corrected for frequency-dependent variations in laser power. A grating spectrometer (wavemeter) was used to calibrate the absolute frequency of the FEL (OPO).

4.3. Time-Dependent Measurements of the Isomerization Reaction by Selective IR Photodissociation. Four steps were used for these experiments: (1) Isolation and CID fragmentation of the precursor ions at m/z 208 (1-H) and m/z 209 (1-D), respectively, to induce CO₂ loss and product ion formation at m/z 164 or 165, respectively. (2) Isolation of the CID product ions at m/z 164 (mixture of carbene 2-H and aldehyde 3-H of unknown ratio) from 1-H and analogously at m/z 165 from 1-D. (3) Variable delay of 0 to 20 s. (4) IRMPD at 1300 cm^{-1} of m/z 164 or m/z 165 ions for 1 s. Eleven data points (each an average of four mass spectra) were triply measured for these time-dependent measurements by increasing the delay in steps of 2 s. The dissociation yield (normalized total fragment ion intensity = IR yield) for the nondeuterated species decreases from approximately 0.6 at $t = 0$ s, to approximately 0.14 at $t = 20$ s. For the deuterated species, the IR yield is nearly constant over the full range of delay times. We note that the difference in the dissociation yields between the nondeuterated/deuterated species at 1300 cm^{-1} in their respective IR spectra corresponds closely to the difference in yields measured here at $t = 0$ s. The dissociation yield at 1300 cm^{-1} is taken as a diagnostic for the fraction of m/z 164 ions being in the carbene isomeric form (compare experimental spectra in Figure 1a and 1b).

4.4. Two Color IR-IR Isomer Selective Infrared Ion Spectroscopy. The first laser set at a fixed frequency dissociates all ions

resonant at that selected frequency, here 3553 cm^{-1} . A 10 W cw-OPO (Argos 2400 BB) was used as the “burn”-laser. A second, tunable laser is then used to record the IR spectrum of the remaining ions (those that were transparent to the frequency of the first laser), in an analogous manner as the single laser experiments described above. Specifically, CID product ions at m/z 164 (unknown mixture of carbene 2-H and aldehyde 3-H) were generated from the m/z 208 precursor ion. We note that after decarboxylation, the ions are collisionally cooled before IR irradiation (10 s of ms separation between these steps).^{18,19,26} After isolation of m/z 164, the ions were irradiated for 40 ms with the output from the cw-OPO tuned to the carbene OH stretch at 3553 cm^{-1} , which depletes all ions in the trap absorbing at this frequency, i.e., having a hydroxycarbene structure. The aldehyde 3-H isomer has no resonances near this frequency and remains unaffected. After 40 ms, further depletion of the m/z 164 signal was not observed, indicating that all hydroxycarbene ions were removed from the population. The remaining ions at m/z 164 (those transparent at 3553 cm^{-1}) were again mass-isolated and held in the trap for 1 s while being irradiated by the FEL, which was tuned point-by-point over the 800–1800 cm^{-1} region. Thus, an isomer-selective IR spectrum was obtained.

A two-color IR-IR approach was also used to selectively measure the IR spectrum of the fragmentation product of the hydroxycarbene 2-H, species resulting from $\cdot\text{CH}_3$ loss (m/z 149). As described in the IR-IR scheme above, CID product ions at m/z 164 (mixture of carbene 2-H and aldehyde 3-H) were isolated and irradiated at 3553 cm^{-1} by the cw-OPO. This selectively induces dissociation of the carbene species, but not of the aldehyde species. In the next step, rather than isolate the remaining ions at m/z 164 (which are assumed to be aldehyde 3-H), the fragment ions from the hydroxycarbene 2-H at m/z 149 were instead mass-isolated. An IRMPD spectrum was then recorded using the FEL selectively for this $\cdot\text{CH}_3$ -loss product of the carbene species.

4.5. Computations. Density functional theory (DFT) calculations were performed using Gaussian09, version D.01.³¹ Gaussian was compiled with Gaussian-supplied versions of BLAS and ATLAS.³² The B3LYP³³ functional was used throughout this study with the GD3-BJ correction³⁴ to account for dispersion interactions, whereby it is noted that in this case the correction did not significantly affect the results in comparison to the bare B3LYP functional. The cc-pVTZ basis³⁵ set was used throughout with the ultrafine setting for the integrals. This computational procedure is an improvement on the procedure from our earlier work, which already gave a good correlation with experiments.^{36–38} All the calculations performed on these systems were done *in vacuo*. Intrinsic reaction coordinate (IRC) calculations were performed with the calculation of frequencies at every step of the profile. The calculation of the barrier penetration integral was done using the IRC profile following the procedure used by Schreiner et al. outlined in their Supporting Information,⁸ using atomic units throughout. CCSD(T)-F12b³⁹ calculations were carried out with the MOLPRO package of ab initio programs,⁴⁰ using the cc-pVDZ-F12 basis set⁴¹ along with matching auxiliary fitting bases.⁴² The geminal Slater exponent was set to 1.0 a_0^{-1} .

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/jacs.6b10348.

Experimental details of the synthesis of the carbene precursors and reference aldehydes; Cartesian coordinates and energies of all calculated structures, zero-point corrected energy profile of the carbene formation and the isomerization to the respective aldehyde; Additional Figures and Tables (PDF)

X-ray data of 4-(trimethylammonio)benzaldehyde (3-H) (CIF)

X-ray data of [4-(dimethylamino)-phenyl]oxo(O²H)-acetic acid (S-2-D) (CIF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*mathias.schaefer@uni-koeln.de

*j.oomens@science.ru.nl

*berkessel@uni-koeln.de

*a.meijer@sheffield.ac.uk

ORCID 

Jonathan Martens: 0000-0001-9537-4117

Albrecht Berkessel: 0000-0003-0470-7428

Anthony J. H. M. Meijer: 0000-0003-4803-3488

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Professor Stefan Schlemmer, Institute of Physics, University of Cologne and Professor Frank Turecek, University of Washington, Seattle, USA for critical discussion of the experiments and results, Dr. Jörg Neudörfel, Department of Chemistry, University of Cologne, for X-ray crystallography, BSc Thomas Thomulka for synthesizing **1-H**, and BSc Rianne van Outersterp for assistance with the time-dependent IR measurements. We wish to thank Dr. J. Grant Hill of the University of Sheffield for his help in running the CCSD(T) calculations. The skillful assistance of the entire FELIX staff is gratefully acknowledged. A license for the OpenEye tools, obtained via the free academic licensing program, is gratefully acknowledged. Funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) under grant agreement no. 312284, and by the Fonds der Chemischen Industrie is gratefully acknowledged.

■ REFERENCES

- (1) Bell, R. P. *The Tunnel Effect in Chemistry*; Chapman & Hall: New York, 1980.
- (2) (a) McMahan, R. J. *Science* **2003**, *299*, 833–834. (b) Borden, W. T. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2016**, *6*, 20–46. (c) Kästner, J. *WIREs Comp. Mol. Sci.* **2014**, *4*, 158–168.
- (3) Bothma, J. P.; Gilmore, J. B.; McKenzie, R. H. *New J. Phys.* **2010**, *12*, 055002.
- (4) (a) Roston, D.; Islam, Z.; Kohen, A. *Molecules* **2013**, *18*, 5543–5567. (b) Kohen, A.; Cannio, R.; Bartolucci, S.; Klinman, J. P. *Nature* **1999**, *399*, 496–499.
- (5) Meisner, J.; Kästner, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 5400–5413.
- (6) Schreiner, P. R.; Reisenauer, H. P.; Pickard, F. C., IV; Simmonett, A. C.; Allen, W. D.; Mátyus, E.; Császár, A. G. *Nature* **2008**, *453*, 906–909.
- (7) Schreiner, P. R.; Reisenauer, R. P.; Ley, D.; Gerbig, D.; Wu, C.-H.; Allen, W. D. *Science* **2011**, *332*, 1300–1303.
- (8) Gerbig, D.; Reisenauer, H. P.; Wu, C. H.; Ley, D.; Allen, W. D.; Schreiner, P. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7273–7275.
- (9) Bucher, G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 6957–6958.
- (10) Zuep, P. S.; Sheridan, R. S.; Albu, T. V.; Truhlar, D. G.; Hrovat, D. A.; Borden, W. T. *Science* **2003**, *299*, 867–870.
- (11) O'Hair, R. A.; Rijs, N. J. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 329–340.
- (12) (a) Jordan, F.; Patel, H. *ACS Catal.* **2013**, *3*, 1601–1617. (b) Breslow, R. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 146–153. (c) Frank, R. A. W.; Leeper, F. J.; Luisi, B. F. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 892–905.
- (13) (a) Martens, J.; Grzetic, J.; Berden, G.; Oomens, J. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11754. (b) Martens, J.; Berden, G.; Gebhardt, C. R.; Oomens, J. *Rev. Sci. Instrum.* **2016**, *87*, 103108.
- (14) Gross, M. L. Charge-Remote Fragmentation: Applications and Mechanism. In *The Encyclopedia of Mass Spectrometry*; Gross, M. L., Caprioli, R., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2005; Vol 4, pp 361–370.
- (15) (a) Polfer, N. C. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2211–2221. (b) Polfer, N. C.; Oomens, J. *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28*, 468–494. (c) Roithova, J. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 547–559.
- (16) Martens, J. K.; Grzetic, J.; Berden, G.; Oomens, J. *Int. J. Mass Spectrom.* **2015**, *377*, 179–187.
- (17) So, S.; Kirk, B. B.; Trevitt, A. J.; Wille, U.; Blanksby, S. J.; da Silva, G. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 24954–24964.
- (18) (a) McLuckey, S. A.; Goeringer, D. E. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 461–474. (b) Gabelica, V.; De Pauw, E. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 566–587.
- (19) (a) March, R. E. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 351–369. (b) March, R. E. Ion Traps. In *The Encyclopedia of Mass Spectrometry*; Gross, M. E., Caprioli, R., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2004; Vol 1, pp 144–158.
- (20) Anslyn, E. V.; Dougherty, D. A. *Modern Physical Organic Chemistry*; University Science Books: Sausalito, CA, 2006.
- (21) Kim, Y.; Kreevoy, M. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7116–7123.
- (22) Osterheld, T. H.; Brauman, J. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7158–7164.
- (23) Ley, D.; Gerbig, D.; Wagner, J. P.; Reisenauer, H. P.; Schreiner, P. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13614–13621.
- (24) Derkits, D.; Wiseman, A.; Snead, R. F.; Dows, M.; Harge, J.; Lamp, J. A.; Gronert, S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2016**, *27*, 339–343.
- (25) Donald, W. A.; Khairallah, G. N.; O'Hair, R. A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2013**, *24*, 811–815.
- (26) Pepin, R.; Tureček, F. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 2818–2826.
- (27) Enders, D.; Niemeier, O.; Henseler, A. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5606–5655.
- (28) Hopkinson, M. N.; Richter, C.; Schedler, M.; Glorius, F. *Nature* **2014**, *510*, 485–496.
- (29) Flanigan, D. M.; Romanov-Michailidis, F.; White, N. A.; Rovis, T. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 9307–9387.
- (30) (a) O'Hair, R. A. *J. Int. J. Mass Spectrom.* **2015**, *377*, 121–129. (b) Fiebig, L.; Schlörer, N.; Schmalz, H.-G.; Schäfer, M. *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20*, 4906–4910. (c) Fiebig, L.; Kuttner, J.; Hilt, G.; Schwarzer, M. C.; Frenking, G.; Schmalz, H.-G.; Schäfer, M. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 10485–10493. (d) Vikse, K. L.; McIndoe, J. S. *Pure Appl. Chem.* **2015**, *87*, 361–377.
- (31) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian v. 09*; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.
- (32) (a) Whaley, R. C.; Petit, A. *Software Pract. Exp.* **2005**, *35*, 101–121. (b) Whaley, R. C.; Petit, A.; Dongarra, J. J. *Parallel Comput.* **2001**, *27*, 3–35.
- (33) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
- (34) Grimme, S.; Ehrlich, S.; Goerigk, L. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 1456–1465.
- (35) Kendall, R. A.; Dunning, T. H.; Harrison, R. J. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 6796–6806.
- (36) Holland, M. C.; Berden, G.; Oomens, J.; Meijer, A. J. H. M.; Schäfer, M.; Gilmour, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014* (26), 5675–5680.
- (37) Massah, A. R.; Dreiocker, F.; Jackson, R. F. W.; Pickup, B. T.; Oomens, J.; Meijer, A. J. H. M.; Schäfer, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 13255–13267.

(38) Ross, A. J.; Dreiocker, F.; Schäfer, M.; Oomens, J.; Meijer, A. J. H. M.; Pickup, B. T.; Jackson, R. F. W. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 1727–1734.

(39) Knizia, G.; Adler, T. B.; Werner, H.-J. *J. Chem. Phys.* **2009**, *130*, 054104.

(40) (a) Werner, H.-J.; Knowles, P. J.; Knizia, G.; Manby, F. R.; Schütz, M.; Celani, P.; Korona, T.; Lindh, R.; Mitrushenkov, A.; Rauhut, G.; Shamasundar, K. R.; Adler, T. B.; Amos, R. D.; Bernhardsson, A.; Berning, A.; Cooper, D. L.; Deegan, M. J. O.; Dobbyn, A. J.; Eckert, F.; Goll, E.; Hampel, C.; Hesselmann, A.; Hetzer, G.; Hrenar, T.; Jansen, G.; Köppl, C.; Liu, Y.; Lloyd, A. W.; Mata, R. A.; May, A. J.; McNicholas, S. J.; Meyer, W.; Mura, M. E.; Nicklass, A.; O'Neill, D. P.; Palmieri, P.; Peng, D.; Pflüger, K.; Pitzer, R.; Reiher, M.; Shiozaki, T.; Stoll, H.; Stone, A. J.; Tarroni, R.; Thorsteinsson, T.; Wang, M. *MOLPRO, A Package of Ab Initio Programs*, v. 2012.1; 2012. (b) Werner, H. J.; Knowles, P. J.; Knizia, G.; Manby, F. R.; Schütz, M. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2*, 242–253.

(41) Peterson, K. A.; Adler, T. B.; Werner, H.-J. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 084102–1–12.

(42) (a) Weigend, F. A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, *4*, 4285–4291. (b) Yousaf, K. E.; Peterson, K. A. *J. Chem. Phys.* **2008**, *129*, 184108. (c) Kritikou, S.; Hill, J. G. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 5269–5276.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Rowinska-Zyrek, M.; Witkowska, D.; Potocki, S.; Remelli, M.; Kozlowski, H. His-rich sequences - is plagiarism from nature a good idea? *New Journal of Chemistry* **2013**, *37*, 58-70.
- (2) Faller, P.; Hureau, C.; La Penna, G. Metal Ions and Intrinsically Disordered Proteins and Peptides: From Cu/Zn Amyloid- β to General Principles. *Accounts of Chemical Research* **2014**, *47*, 2252-2259.
- (3) Miraula, M.; Ciurli, S.; Zambelli, B. Intrinsic disorder and metal binding in UreG proteins from Archae hyperthermophiles: GTPase enzymes involved in the activation of Ni(II) dependent urease. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2015**, *20*, 739-755.
- (4) Witkowska, D.; Politano, R.; Rowinska-Zyrek, M.; Guerrini, R.; Remelli, M.; Kozlowski, H. The Coordination of Ni(II) and Cu(II) Ions to the Polyhistidyl Motif of Hpn Protein: Is It as Strong as We Think? *Chemistry – A European Journal* **2012**, *18*, 11088-11099.
- (5) Lewisch, S. A.; Levine, R. L. Determination of 2-Oxohistidine by Amino Acid Analysis. *Analytical Biochemistry* **1995**, *231*, 440-446.
- (6) Uchida, K. Histidine and lysine as targets of oxidative modification. *Amino Acids* **2003**, *25*, 249-257.
- (7) Inoue, K.; Garner, C.; Ackermann, B. L.; Oe, T.; Blair, I. A. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry characterization of oxidized amyloid beta peptides as potential biomarkers of Alzheimer's disease. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2006**, *20*, 911-918.
- (8) Lam, A. K. Y.; Hutton, C. A.; O'Hair, R. A. J. Role of 2-oxo and 2-thioxo modifications on the proton affinity of histidine and fragmentation reactions of protonated histidine. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2010**, *24*, 2591-2604.
- (9) Martens, J.; Grzetic, J.; Berden, G.; Oomens, J. Structural identification of electron transfer dissociation products in mass spectrometry using infrared ion spectroscopy. *Nature Communications* **2016**, *7*, 11754.
- (10) Peckelsen, K.; Martens, J.; Berden, G.; Oomens, J.; Dunbar, R. C.; Meijer, A. J. H. M.; Schäfer, M. Gas-phase complexes of Ni²⁺ and Ca²⁺ with deprotonated histidylhistidine (HisHis): A model case for polyhistidyl-metal binding motifs. *Journal of Molecular Spectroscopy* **2017**, *332*, 38-44.
- (11) Peckelsen, K.; Martens, J.; Czypiel, L.; Oomens, J.; Berden, G.; Grundemann, D.; Meijer, A. J. H. M.; Schäfer, M. Ergothioneine and related histidine derivatives in the gas phase: tautomer structures determined by IRMPD spectroscopy and theory. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2017**, *19*, 23362-23372.
- (12) Schäfer, M.; Peckelsen, K.; Paul, M.; Martens, J.; Oomens, J.; Berden, G.; Berkessel, A.; Meijer, A. J. H. M. Hydrogen Tunneling Above Room Temperature Evidenced by Infrared Ion Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139*, 5779-5786.
- (13) Dreiocker, F.; Oomens, J.; Meijer, A. J. H. M.; Pickup, B. T.; Jackson, R. F. W.; Schäfer, M. Structure Elucidation of Dimethylformamide-Solvated Alkylzinc Cations in the Gas Phase. *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, *75*, 1203-1213.

- (14) Seo, J.; Hoffmann, W.; Warnke, S.; Bowers, M. T.; Pagel, K.; Helden, G. v. Retention of Native Protein Structures in the Absence of Solvent: A Coupled Ion Mobility and Spectroscopic Study. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55*, 14173-14176.
- (15) Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. L.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B. Molecular Beams of Macroions. *The Journal of Chemical Physics* **1968**, *49*, 2240-2249.
- (16) Fenn, J.; Mann, M.; Meng, C.; Wong, S.; Whitehouse, C. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **1989**, *246*, 64-71.
- (17) Kebarle, P.; Verkerk, U. H. Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrometry Reviews* **2009**, *28*, 898-917.
- (18) Kebarle, P.; Tang, L. From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **1993**, *65*, 972A-986A.
- (19) Taylor, G. Disintegration of water drops in an electric field. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* **1964**, *280*, 383-397.
- (20) Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. L.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B. Gas Phase Macroions. *Macromolecules* **1968**, *1*, 96-97.
- (21) Felitsyn, N.; Peschke, M.; Kebarle, P. Origin and number of charges observed on multiply-protonated native proteins produced by ESI. *International Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *219*, 39-62.
- (22) Cole, R. B. Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35*, 763-772.
- (23) Kebarle, P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35*, 804-817.
- (24) Cech, N. B.; Enke, C. G. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews* **2001**, *20*, 362-387.
- (25) Berkel, G. J. V.; Kertesz, V. Using the electrochemistry of the electrospray ion source. *Analytical Chemistry* **2007**, *75*, 5510-5520.
- (26) Niessen, W. M. A.: *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, Third Edition*; CRC Press, 2006.
- (27) Gross, J. H.: *Massenspektrometrie-Ein Lehrbuch*; Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 2013.
- (28) Steill, J. D.; Oomens, J. Gas-Phase Deprotonation of p-Hydroxybenzoic Acid Investigated by IR Spectroscopy: Solution-Phase Structure Is Retained upon ESI. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 13570-13571.
- (29) O'Hair, R. A. J. The 3D quadrupole ion trap mass spectrometer as a complete chemical laboratory for fundamental gas-phase studies of metal mediated chemistry. *Chemical Communications* **2006**, 1469-1481.
- (30) Atkins, P. W.; De Paula, J.: *Physikalische Chemie*; Wiley-VCH, 2013.
- (31) Schwarz, H. Chemistry with Methane: Concepts Rather than Recipes. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 10096-10115.
- (32) Speranza, M. Gas-phase ion chemistry versus solution chemistry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1992**, *118-119*, 395-447.

- (33) Khreis, J. M.; Reitshammer, J.; Vizcaino, V.; Klawitter, K.; Feketeová, L.; Denifl, S. High-energy collision-induced dissociation of histidine ions $[\text{His} + \text{H}]^+$ and $[\text{His} - \text{H}]^-$ and histidine dimer $[\text{His}_2 + \text{H}]^+$. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2018**, *32*, 113-120.
- (34) Aleksey, V.; Konstantin, O. Z.; Ünige, A. L.; Yury, O. T. On the Use of Electron Capture Rate Constants to Describe Electron Capture Dissociation Mass Spectrometry of Peptides. *European Journal of Mass Spectrometry* **2015**, *21*, 451-458.
- (35) Shukla, A. K. Surface-induced dissociation of methanol cations: A non-ergodic process. *International Journal of Mass Spectrometry* **2017**, *422*, 94-97.
- (36) Yan, J.; Zhou, M.; Gilbert, J. D.; Wolff, J. J.; Somogyi, Á.; Pedder, R. E.; Quintyn, R. S.; Morrison, L. J.; Easterling, M. L.; Paša-Tolić, L.; Wysocki, V. H. Surface-Induced Dissociation of Protein Complexes in a Hybrid Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry* **2017**, *89*, 895-901.
- (37) Fenn, J. B. Electrospray Wings for Molecular Elephants (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42*, 3871-3894.
- (38) Gross, M. L.; Caprioli, R. M.; Armentrout, P. B.: *The encyclopedia of mass spectrometry*; Elsevier Science, 2003.
- (39) Patrick, A. L.; Polfer, N. C.: Peptide Fragmentation Products in Mass Spectrometry Probed by Infrared Spectroscopy. In *Gas-Phase IR Spectroscopy and Structure of Biological Molecules*; Rijs, A. M., Oomens, J., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp 153-181.
- (40) Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B.: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*; Thieme, 2005.
- (41) Polfer, N. C.; Oomens, J. Vibrational spectroscopy of bare and solvated ionic complexes of biological relevance. *Mass Spectrometry Reviews* **2009**, *28*, 468-494.
- (42) Patrick, A. L.; Stedwell, C. N.; Schindler, B.; Compagnon, I.; Berden, G.; Oomens, J.; Polfer, N. C. Insights into the fragmentation pathways of gas-phase protonated sulfoserine. *International Journal of Mass Spectrometry* **2015**, *379*, 26-32.
- (43) Oomens, J.; Sartakov, B. G.; Meijer, G.; von Helden, G. Gas-phase infrared multiple photon dissociation spectroscopy of mass-selected molecular ions. *International Journal of Mass Spectrometry* **2006**, *254*, 1-19.
- (44) Reider, G. A.: Nichtlineare Optik und Akustooptik. In *Photonik: Eine Einführung in die Grundlagen*; Springer Vienna: Vienna, 2012; pp 333-389.
- (45) Roithova, J. Characterization of reaction intermediates by ion spectroscopy. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 547-559.
- (46) Makarov, A. A.; Petrova, I. Y.; Ryabov, E. A.; Letokhov, V. S. Statistical Inhomogeneous Broadening of Infrared and Raman Transitions in Highly Vibrationally Excited XY₆ Molecules. *The Journal of Physical Chemistry A* **1998**, *102*, 1438-1449.
- (47) Rijs, A. M.; Oomens, J.: *Gas-Phase IR Spectroscopy and Structure of Biological Molecules*; Springer International Publishing, 2015.
- (48) Bush, M. F.; O'Brien, J. T.; Prell, J. S.; Saykally, R. J.; Williams, E. R. Infrared Spectroscopy of Cationized Arginine in the Gas Phase: Direct Evidence for the Transition from Nonzwitterionic to Zwitterionic Structure. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 1612-1622.
- (49) Jockusch, R. A.; Price, W. D.; Williams, E. R. Structure of Cationized Arginine ($\text{Arg} \cdot \text{M}^+$, $\text{M} = \text{H}, \text{Li}, \text{Na}, \text{K}, \text{Rb}, \text{and Cs}$) in the Gas Phase: Further Evidence for Zwitterionic Arginine. *The journal of physical chemistry. A* **1999**, *103*, 9266-9274.

- (50) Solcà, N.; Dopfer, O. Selective infrared photodissociation of protonated para-fluorophenol isomers: Substitution effects in oxonium and fluoronium ions. *The Journal of Chemical Physics* **2004**, *121*, 769-772.
- (51) Skurski, P.; Simons, J. An excess electron bound to urea. I. Canonical and zwitterionic tautomers. *The Journal of Chemical Physics* **2001**, *115*, 8373-8380.
- (52) Strittmatter, E. F.; Williams, E. R. Structures of Protonated Arginine Dimer and Bradykinin Investigated by Density Functional Theory: Further Support for Stable Gas-Phase Salt Bridges. *The Journal of Physical Chemistry A* **2000**, *104*, 6069-6076.
- (53) Dunbar, R. C. Complexation of Na⁺ and K⁺ to Aromatic Amino Acids: A Density Functional Computational Study of Cation- π Interactions. *The Journal of Physical Chemistry A* **2000**, *104*, 8067-8074.
- (54) Wolf, F. F.; Klare, H.; Goldfuss, B. Asymmetric Michael Additions of 4-Hydroxycoumarin to β -Nitrostyrenes with Chiral, Bifunctional Hydrogen-Bonding Catalysts. *The Journal of Organic Chemistry* **2016**, *81*, 1762-1768.
- (55) Ramachandran, K. I.; Deepa, G.; Namboori, K.: *Computational Chemistry and Molecular Modeling*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008; Vol. 1.
- (56) Hofmann, M.: Computer-Chemie. Heidelberg, R.-K.-U., Ed., 2003.
- (57) Hartke, B.: Einführung in die Computerchemie. Kiel, C.-A.-U. a., Ed., 2016.
- (58) Dykstra, C. E. Electrostatic interaction potentials in molecular force fields. *Chemical Reviews* **1993**, *93*, 2339-2353.
- (59) W.D. Cornell; P. Cieplak; C.P. Bayly; I.R. Gloud; K.M. Merz; D.M. Ferguson; D.C. Spellmeyer; T. Fox; D.T. Caldwell; Kollmann, P. A. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules *J. Am. Chem. SOC* **1995**, *117*, 5179-5197.
- (60) B. R. Brooks; C. L. Brooks III; A. D. Mackerell; L. Nilsson; R. J. Petrella; B. Roux; Y. Won; G. Archontis; C. Bartels; S. Boresch A. Caflisch; L. Caves; Q. Cui; A. R. Dinner; M. Feig; S. Fischer; J. Gao; M. Hodoscek; W. Im; K. Kuczera; T. Lazaridis; J. Ma; V. Ovchinnikov; E. Paci; R. W. Pastor; C. B. Post; J. Z. Pu; M. Schaefer; B. Tidor; R. M. Venable; H. L. Woodcock; X. Wu; W. Yang; D. M. York; Karplus, M. CHRAMM: The Biomolecular simulation Program. *J. Comp. Chem.* **2009**, *30*, 1545-1615.
- (61) B. R. Brooks; R. E. Bruccoleri; B. D. Olafson; D. J. States; S. Swaminathan; Karplus, M. CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J. Comp. Chem.* **1983**, *4*, 187-217.
- (62) Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D.; van Drunen, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications* **1995**, *91*, 43-56.
- (63) Allinger, N. L. Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, 8127-8134.
- (64) Halgren, T. A. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*.
- (65) Mortimer, C. E.; Müller, U.; Beck, J.: *Chemie: Das Basiswissen der Chemie*; Thieme, 2007.
- (66) Born, M.; Oppenheimer, R. Zur Quantentheorie der Molekeln. *Annalen der Physik* **1927**, *389*, 457-484.
- (67) Hartree, D. R. The Wave Mechanics of an Atom with a non-Coulomb Central Field. Part III. Term Values and Intensities in Series in Optical Spectra. *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society* **2008**, *24*, 426-437.

- (68) Cremer, D. Møller–Plesset perturbation theory: from small molecule methods to methods for thousands of atoms. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* **2011**, *1*, 509-530.
- (69) Čížek, J. On the Correlation Problem in Atomic and Molecular Systems. Calculation of Wavefunction Components in Ursell-Type Expansion Using Quantum-Field Theoretical Methods. *The Journal of Chemical Physics* **1966**, *45*, 4256-4266.
- (70) Hohenberg, P.; Kohn, W. Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review* **1964**, *136*, B864-B871.
- (71) Kohn, W.; Sham, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review* **1965**, *140*, A1133-A1138.
- (72) Perdew, J. P.; Ruzsinszky, A.; Tao, J.; Staroverov, V. N.; Scuseria, G. E.; Csonka, G. I. Prescription for the design and selection of density functional approximations: More constraint satisfaction with fewer fits. *The Journal of Chemical Physics* **2005**, *123*, 062201.
- (73) Cramer, C. J.: *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*; Wiley: Chichester, England, 2004; Vol. 2. pp. 618.
- (74) Grimme, S.; Ehrlich, S.; Goerigk, L. Effect of the damping function in dispersion corrected density functional theory. *Journal of Computational Chemistry* **2011**, *32*, 1456-1465.
- (75) Prell, J. S.; O'Brien, J. T.; Steill, J. D.; Oomens, J.; Williams, E. R. Structures of Protonated Dipeptides: The Role of Arginine in Stabilizing Salt Bridges. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 11442-11449.
- (76) Genghof, D. S.; Damme, O. V. Biosynthesis of Ergothioneine and Hercynine by Microbacteria. *Journal of Bacteriology* **1964**, *87*, 852-862.
- (77) Genghof, D. S. Biosynthesis of Ergothioneine and Hercynine by Fungi and Actinomycetales. *Journal of Bacteriology* **1970**, *103*, 475-478.
- (78) Kimura, C.; Nukina, M.; Igarashi, K.; Sugawara, Y. beta-Hydroxyergothioneine, a New Ergothioneine Derivative from the Mushroom *Lyophyllum connatum*, and Its Protective Activity against Carbon Tetrachloride-Induced Injury in Primary Culture Hepatocytes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2005**, *69*, 357-363.
- (79) Seebeck, F. P. In Vitro Reconstitution of Mycobacterial Ergothioneine Biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 6632-6633.
- (80) Pfeiffer, C.; Bauer, T.; Surek, B.; Schömig, E.; Gründemann, D. Cyanobacteria produce high levels of ergothioneine. *Food Chemistry* **2011**, *129*, 1766-1769.
- (81) Fu, P.; MacMillan, J. B. Spithioneines A and B, Two New Bohemamine Derivatives Possessing Ergothioneine Moiety from a Marine-Derived *Streptomyces spinoverrucosus*. *Organic Letters* **2015**, *17*, 3046-3049.
- (82) Tanret, M. *Comptes Rendus Chimie* **1909**, *49*, 22-224.
- (83) Gründemann, D.; Harlfinger, S.; Golz, S.; Geerts, A.; Lazar, A.; Berkels, R.; Jung, N.; Rubbert, A.; Schömig, E. Discovery of the ergothioneine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 5256-5261.
- (84) Gründemann, D. The ergothioneine transporter controls and indicates ergothioneine activity — A review. *Preventive Medicine* **2012**, *54*, Supplement, S71-S74.
- (85) Guo, Q.-L.; Lin, S.; Wang, Y.-N.; Zhu, C.-G.; Xu, C.-B.; Shi, J.-G. Gastrolatathioneine, an unusual ergothioneine derivative from an aqueous extract of

“tian ma”: A natural product co-produced by plant and symbiotic fungus. *Chinese Chemical Letters* **2016**, *27*, 1577-1581.

(86) Melville, D. B.; Eich, S.; Ludwig, M. L. Biosynthesis of Ergothioneine. *Journal of Biological Chemistry* **1957**, *224*, 871-877.

(87) A, A.; DB., M. The reaction sequence in ergothioneine biosynthesis: hercynine as an intermediate. *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 1615-1618.

(88) Shukla, Y.; Kulshrestha, O. P.; Khuteta, K. P. Ergothioneine content in normal and senile human cataractous lenses. *Indian Journal of Medical Research* **1981**, *73*, 472-473.

(89) Shires, T. K.; Brummel, M. C.; Pulido, J. S.; Stegink, L. D. Ergothioneine Distribution in Bovine and Porcine Ocular Tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **1997**, *117*, 117-120.

(90) Paul, B. D.; Snyder, S. H. The unusual amino acid L-ergothioneine is a physiologic cytoprotectant. *Cell Death & Differentiation* **2010**, *17*, 1134-1140.

(91) Pfeiffer, C.; Bach, M.; Bauer, T.; Campos da Ponte, J.; Schömig, E.; Gründemann, D. Knockout of the ergothioneine transporter ETT in zebrafish results in increased 8-oxoguanine levels. *Free Radical Biology and Medicine* **2015**, *83*, 178-185.

(92) Stoffels, C.; Oumari, M.; Perrou, A.; Termath, A.; Schlundt, W.; Schmalz, H.-G.; Schäfer, M.; Wewer, V.; Metzger, S.; Schömig, E.; Gründemann, D. Ergothioneine stands out from hercynine in the reaction with singlet oxygen: Resistance to glutathione and TRIS in the generation of specific products indicates high reactivity. *Free Radical Biology and Medicine* **2017**, *113*, 385-394.

(93) Sugihara, A.; Uemura, K.; Matsuura, Y.; Tanaka, N.; Ashida, T.; Kakudo, M. The crystal structure of l-ergothioneine dihydrate, C₉H₁₅N₃O₂S·2H₂O. *Acta Crystallographica Section B* **1976**, *32*, 181-185.

(94) Chaudière, J.; Ferrari-Iliou, R. Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms. *Food and Chemical Toxicology* **1999**, *37*, 949-962.

(95) García-de-la-Asunción, J.; García-del-Olmo, E.; Galan, G.; Guijarro, R.; Martí, F.; Badenes, R.; Perez-Griera, J.; Duca, A.; Delgado, C.; Carbonell, J.; Belda, J. Glutathione oxidation correlates with one-lung ventilation time and PO₂/FiO₂ ratio during pulmonary lobectomy. *Redox Report* **2016**, *21*, 219-226.

(96) Madelin, G.; Babb, J.; Xia, D.; Regatte, R. R. Repeatability of Quantitative Sodium Magnetic Resonance Imaging for Estimating Pseudo-Intracellular Sodium Concentration and Pseudo-Extracellular Volume Fraction in Brain at 3 T. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0118692.

(97) Valle, J. J.; Eyler, J. R.; Oomens, J.; Moore, D. T.; van der Meer, A. F. G.; von Helden, G.; Meijer, G.; Hendrickson, C. L.; Marshall, A. G.; Blakney, G. T. Free electron laser-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry facility for obtaining infrared multiphoton dissociation spectra of gaseous ions. *Review of Scientific Instruments* **2005**, *76*, 023103.

(98) Martens, J.; Berden, G.; Gebhardt, C. R.; Oomens, J. Infrared ion spectroscopy in a modified quadrupole ion trap mass spectrometer at the FELIX free electron laser laboratory. *Review of Scientific Instruments* **2016**, *87*, 103108.

(99) Polfer, N. C.; Oomens, J.; Moore, D. T.; von Helden, G.; Meijer, G.; Dunbar, R. C. Infrared Spectroscopy of Phenylalanine Ag(I) and Zn(II) Complexes in the Gas Phase. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 517-525.

- (100) Fridgen, T. D. Infrared consequence spectroscopy of gaseous protonated and metal ion cationized complexes. *Mass Spectrometry Reviews* **2009**, *28*, 586-607.
- (101) Almasian, M.; Grzetic, J.; van Maurik, J.; Steill, J. D.; Berden, G.; Ingemann, S.; Buma, W. J.; Oomens, J. Non-Equilibrium Isomer Distribution of the Gas-Phase Photoactive Yellow Protein Chromophore. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2012**, *3*, 2259-2263.
- (102) Stipdonk, M. J.; Kullman, M. J.; Berden, G.; Oomens, J. Infrared multiple-photon dissociation spectroscopy of deprotonated 6-hydroxynicotinic acid. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2014**, *28*, 691-698.
- (103) Motohashi, N.; Mori, I.; Sugiura, Y. ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance and Raman Spectroscopic Studies on Ionization and Mercury Complex of Ergothioneine. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1976**, *24*, 1737-1741.
- (104) Citir, M.; Hinton, C. S.; Oomens, J.; Steill, J. D.; Armentrout, P. B. Infrared multiple photon dissociation spectroscopy of protonated histidine and 4-phenyl imidazole. *International Journal of Mass Spectrometry* **2012**, *330-332*, 6-15.
- (105) Citir, M.; Hinton, C. S.; Oomens, J.; Steill, J. D.; Armentrout, P. B. Infrared Multiple Photon Dissociation Spectroscopy of Cationized Histidine: Effects of Metal Cation Size on Gas-Phase Conformation. *The Journal of Physical Chemistry A* **2012**, *116*, 1532-1541.
- (106) Warnke, S.; Seo, J.; Boschmans, J.; Sobott, F.; Scrivens, J. H.; Bleiholder, C.; Bowers, M. T.; Gewinner, S.; Schöllkopf, W.; Pagel, K.; von Helden, G. Protomers of Benzocaine: Solvent and Permittivity Dependence. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137*, 4236-4242.
- (107) Harvey Lodish, A. B., S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell.: *Molecular Cell Biology, 4th edition*; W. H. Freeman: New York, 2000.
- (108) Dunbar, R. C.; Hopkinson, A. C.; Oomens, J.; Siu, C.-K.; Siu, K. W. M.; Steill, J. D.; Verkerk, U. H.; Zhao, J. Conformation Switching in Gas-Phase Complexes of Histidine with Alkaline Earth Ions. *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 10403-10408.
- (109) Roth, A.; Breaker, R. R. An amino acid as a cofactor for a catalytic polynucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95*, 6027-6031.
- (110) Porath, J. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expression and Purification* **1992**, *3*, 263-281.
- (111) Dunbar, R. *Gas-Phase IR Spectroscopy and Structure of Biological Molecules, Vol. 364, Topics in Current Chemistry* **2015**, 183-223.
- (112) Dunbar, R. C.; Berden, G.; Oomens, J. How does a small peptide choose how to bind a metal ion? IRMPD and computational survey of CS versus Iminol binding preferences. *International Journal of Mass Spectrometry* **2013**, *354-355*, 356-364.
- (113) Dunbar, R. C.; Polfer, N. C.; Berden, G.; Oomens, J. Metal ion binding to peptides: Oxygen or nitrogen sites? *International Journal of Mass Spectrometry* **2012**, *330-332*, 71-77.
- (114) Ke, S.-Y.; Wang, C.-C.; Lee, G.-H.; Chuang, Y.-C.; Lu, K.-L. Highly Thermal-Stable Supramolecular Assembly of a Hydrogen-Bonded Mononuclear Nickel(II) Histidine Compound. *Journal of the Chinese Chemical Society* **2013**, *60*, 807-812.

- (115) Hofstetter, T. E.; Howder, C.; Berden, G.; Oomens, J.; Armentrout, P. B. Structural Elucidation of Biological and Toxicological Complexes: Investigation of Monomeric and Dimeric Complexes of Histidine with Multiply Charged Transition Metal (Zn and Cd) Cations using IR Action Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* **2011**, *115*, 12648-12661.
- (116) Riedel, W.: *Anorganische Chemie*; de Gruyter: New York, 1990; Vol. 2.
- (117) Fraser, K. A.; Harding, M. M. The crystal and molecular structure of bis(histidino)nickel(II) monohydrate. *Journal of the Chemical Society A: Inorganic, Physical, Theoretical* **1967**, 415-420.
- (118) Dunbar, R. C.; Steill, J. D.; Polfer, N. C.; Berden, G.; Oomens, J. Peptide Bond Tautomerization Induced by Divalent Metal Ions: Characterization of the Iminol Configuration. *Angewandte Chemie* **2012**, *124*, 4669-4671.
- (119) Dunbar, R. C.; Oomens, J.; Berden, G.; Lau, J. K.-C.; Verkerk, U. H.; Hopkinson, A. C.; Siu, K. W. M. Metal Ion Complexes with HisGly: Comparison with PhePhe and PheGly. *The Journal of Physical Chemistry A* **2013**, *117*, 5335-5343.
- (120) Dunbar, R. C.; Steill, J. D.; Oomens, J. Encapsulation of Metal Cations by the PhePhe Ligand: A Cation- π Ion Cage. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 9376-9386.
- (121) Glover, M. S.; Dilger, J. M.; Acton, M. D.; Arnold, R. J.; Radivojac, P.; Clemmer, D. E. Examining the Influence of Phosphorylation on Peptide Ion Structure by Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **2016**, *27*, 786-794.
- (122) Cohen, P. The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update. *Trends in Biochemical Sciences* **2000**, *25*, 596-601.
- (123) Hunter, T. Signaling—2000 and Beyond. *Cell* **2000**, *100*, 113-127.
- (124) Levene, P. A.; Alsberg, C. L. THE CLEAVAGE PRODUCTS OF VITELLIN. *Journal of Biological Chemistry* **1906**, *2*, 127-133.
- (125) Lipmann, F. A.; Levene, P. A. SERINEPHOSPHORIC ACID OBTAINED ON HYDROLYSIS OF VITELLINIC ACID. *Journal of Biological Chemistry* **1932**, *98*, 109-114.
- (126) Rogerson, D. T.; Sachdeva, A.; Wang, K.; Haq, T.; Kazlauskaitė, A.; Hancock, S. M.; Huguenin-Dezot, N.; Muqit, M. M. K.; Fry, A. M.; Bayliss, R.; Chin, J. W. Efficient genetic encoding of phosphoserine and its non-hydrolyzable analog. *Nature chemical biology* **2015**, *11*, 496-503.
- (127) Gonzalez-Sanchez, M.-B.; Lanucara, F.; Helm, M.; Evers, Claire E. Attempting to rewrite History: challenges with the analysis of histidine-phosphorylated peptides. *Biochemical Society Transactions* **2013**, *41*, 1089-1095.
- (128) Kee, J.-M.; Muir, T. W. Chasing Phosphohistidine, an Elusive Sibling in the Phosphoamino Acid Family. *ACS Chemical Biology* **2012**, *7*, 44-51.
- (129) Attwood, P. V.; Piggott, M. J.; Zu, X. L.; Besant, P. G. Focus on phosphohistidine. *Amino Acids* **2007**, *32*, 145-156.
- (130) Lilley, M.; Mambwe, B.; Thompson, M. J.; Jackson, R. F. W.; Muimo, R. 4-Phosphopyrazol-2-yl alanine: a non-hydrolysable analogue of phosphohistidine. *Chemical Communications* **2015**, *51*, 7305-7308.
- (131) Hemmer, G. Report/MN-C-E-OC. Universität zu Köln, 2017.
- (132) Lehmann, W. D.: *Protein Phosphorylation Analysis by Electrospray Mass Spectrometry: A guide to concepts and practice*; Royal Society of Chemistry, 2010.

- (133) Gonzalez-Sanchez, M.-B.; Lanucara, F.; Hardman, G. E.; Evers, C. E. Gas-phase intermolecular phosphate transfer within a phosphohistidine phosphopeptide dimer. *International Journal of Mass Spectrometry* **2014**, *367*, 28-34.
- (134) Wolk, A. B.; Leavitt, C. M.; Garand, E.; Johnson, M. A. Cryogenic Ion Chemistry and Spectroscopy. *Accounts of Chemical Research* **2014**, *47*, 202-210.
- (135) Fry, A. J. When Ions Meet: Computational Studies on the Structure of Electrogenerated Ion Pairs. *The Electrochemical Society Interface* **2016**, *25*, 37-40.
- (136) Fagiani, M. R.; Knorke, H.; Esser, T. K.; Heine, N.; Wolke, C. T.; Gewinner, S.; Schollkopf, W.; Gaigeot, M.-P.; Spezia, R.; Johnson, M. A.; Asmis, K. R. Gas phase vibrational spectroscopy of the protonated water pentamer: the role of isomers and nuclear quantum effects. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2016**, *18*, 26743-26754.
- (137) Boersema, P. J.; Mohammed, S.; Heck, A. J. R. Phosphopeptide fragmentation and analysis by mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2009**, *44*, 861-878.
- (138) Chary, V. N.; Kumar, C. D.; Vairamani, M.; Prabhakar, S. Characterization of amino acid-derived betaines by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2012**, *47*, 79-88.
- (139) Polfer, N. C.; Oomens, J. Reaction products in mass spectrometry elucidated with infrared spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2007**, *9*, 3804-3817.
- (140) Enabling the XML interface requires operating TrapControl in "service" mode, f. d. c. a. B. r.
- (141) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J.: Gaussian 09, Revision B.01. Wallingford CT, 2009.
- (142) Clint Whaley, R.; Petitet, A.; Dongarra, J. J. Automated empirical optimizations of software and the ATLAS project. *Parallel Computing* **2001**, *27*, 3-35.
- (143) Whaley, R. C.; Petitet, A. Minimizing development and maintenance costs in supporting persistently optimized BLAS. *Software: Practice and Experience* **2005**, *35*, 101-121.
- (144) Becke, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *Journal of Chemical Physics* **1993**, *98*, 5648.
- (145) Dunning, T. H. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen. *Journal of Chemical Physics* **1989**, *90*, 1007.
- (146) Balabanov, N. B.; Peterson, K. A. Systematically convergent basis sets for transition metals. I. All-electron correlation consistent basis sets for the 3d elements Sc–Zn. *Journal of Chemical Physics* **2005**, *123*, 064107.

(147) Peng, C.; Ayala, P. Y.; Schlegel, H. B.; Frisch, M. J. Using redundant internal coordinates to optimize equilibrium geometries and transition states. *Journal of Computational Chemistry* **1996**, *17*, 49-56.

(148) Brückmann, L.; Tyrre, W.; Mathur, S.; Berden, G.; Oomens, J.; Meijer, A. J. H. M.; Schäfer, M. Examination of the Coordination Sphere of AlIII in Trifluoromethyl-Heteroarylalkenolato Complex Ions by Gas-Phase IRMPD Spectroscopy and Computational Modelling. *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 2037-2045.

(149) Holland, M. C.; Berden, G.; Oomens, J.; Meijer, A. J. H. M.; Schäfer, M.; Gilmour, R. Infrared Multiphoton Dissociation Spectroscopic Analysis of Noncovalent Interactions in Organocatalysis. *European Journal of Organic Chemistry* **2014**, *2014*, 5675-5680.

8 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
API	<i>Atomspheric Pressure Ionisation</i>
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
ber,	berechnet
CID	<i>Collision Induced Dissociation</i>
CNDO	<i>Complete Neglect of Differential Overlap</i>
CRM	<i>Charged Residue Model</i>
CS	<i>Charge Solvation</i>
Da	Dalton
ECD	<i>Electron Capture Dissociation</i>
ED	Elektronen Dichte
ESI	Elektrospray Ionisation
ET	Ergothionein
eq	Äquivalente
FEL	Frei-Elektronen-Laser
FELIX	<i>Free Electron Laser for Infrared Experiments</i>
FT-ICR	<i>Fourier-Transform-Ioncyclotron Resonance</i>
gef.	gefunden
GGA	<i>Generalized Gradient Approximation</i>
GTF	Gauss-Typ-Funktion
HF	Hartree-Fock
HR-MS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
IEM	<i>Ion Evaporation Model</i>
Il	Iminol
Im	Iminolat
INDO	<i>Intermediate Neglect of Differential Overlap</i>
IR	Infrarot
IRMPD	<i>Infrared Multiple Photon Dissociation</i>
IVR	<i>Intramolecular Vibrational Redistribution</i>
kJ	Kilojoule
LDA	<i>Local Density Approximation</i>
m	Meter
MeOH	Methanol
mL	Milliliter
mg	Milligramm
MNDO	<i>Modified Neglect of Differential Overlap</i>
mmol	Millimol
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer
NDDO	<i>Neglect of Diatomic Differential Overlap</i>
OPO	optisch parametrischer Oszillator
PCM	<i>Polarizable Continuum Model</i>
PSE	<i>Potential Energy Surface</i>

QM	Quanten Mechanik
SCF	<i>Self Consistent Field</i>
SCRF	<i>Self Consistent Reaction Field</i>
SID	<i>Surface Induced Dissociation</i>
STO	Slater-Typ-Orbital
V	Volt

Danksagung

Mein Dank gibt zu allererst meinem Doktorvater Prof. Dr. Mathias Schäfer für die hervorragende und intensive Betreuung dieser Arbeit. Durch seine immer offenen Worte bin ich stetig an mir selber gewachsen. Durch die anregenden Diskussionen habe ich oft einen anderen Blickwinkel auf Probleme bekommen und konnte so neue Lösungsansätze finden. Durch die Ermutigung zu Teilnahmen an nationalen und internationalen Konferenzen konnte ich viele neue Kontakte knüpfen und interessante Menschen kennenlernen.

Ich danke Prof. Dr. Hans-Günther Schmalz für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und das geduldige Zuhören bei meinen doch eher Fachfremden Vorträgen und die Bereitstellung der experimentellen Rahmenbedingungen am Institut für organische Chemie der Universität zu Köln.

Zudem möchte ich Prof. Dr. Stephan Schlemmer für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Ich danke ganz herzlich allen Kooperationspartner der FELIX Facility in Nijmegen. Ein besonderer Dank gilt hier Prof. Dr. Jos Oomens, Dr. Giel Berden und Dr. Jonathan Martens. Ohne Jonathan wäre wohl so mache Nachtschicht nicht wirklich produktiv verlaufen, da ich vor Langeweile eingeschlafen wäre.

Ein ganz besonderer Dank gilt hier auch meinen Goldies. Ihr habt mich direkt in eure Gruppe auf der roten Etage aufgenommen und meine Kaffeekonsum nie hinterfragt. Auch die vielen entspannten Feierabende zusammen haben zu einer für mich schönen Promotionszeit beigetragen. Wölfi, Eric und Falco sind dabei mehr als nur Freunde für mich geworden, sondern auch ein Teil meiner Familie. Danke für drei neue Brüder!!

Ich möchte mich auch bei der Grüßen Etage bedanken. Da insbesondere bei Julia, Marco und Shute, die mich ganz herzlich willkommen heißen haben und in meiner Freizeit immer für einen Lacher sorgten. Auch möchte ich Petra danken, die all meine Gelüste nach B&J versteht, auch wenn ich es gerne vor dem Essen in die Mikrowelle stelle. Ich danke dir auch für unsere Gespräche über unser Leid, bei dem wir uns gegenseitig aufgemuntert haben.

Ich danke auch meiner Doppelkopfrunde. Ohne euch hätte ich auf die Montage keinen „Bock“ gehabt.

Auch möchte ich Linda für ihre Tanzeinlagen in der Flotte danken. Es war jedes Mal ein Fest mir unterwegs zu sein. Und danke für deine Last-Minute Versuche mit die Komplexität von 2D-NMR-Experimenten näherzubringen. Und Oli will ich natürlich auch nicht vergessen. Danke fürs Korrekturlesen, auch wenn du gar kein Deutsch kannst!! Ich hoffe du musst nie wieder eine Doktorarbeit aus der OC lesen.

Michael Neihls danke ich für die fachliche Unterstützung bei allen instrumentellen Problemen und die tolle Zusammenarbeit während meiner ganzen Promotion.

Ich bedanke mich außerdem bei allen Mitarbeitern des Institutes für organische Chemie. Dabei im besonderen Anja Bitners, für die Hilfe bei allen administrativen Problemen. Auch Ingo Müller und Hans-Joachim Pauli der Chemikalienausgabe für die immer netten Gespräche während meines Chemikaliendienstes.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Freunden und meiner Familie danken, die mich bei allen Schritten bis hierher unterstützt und gefördert haben.

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, Karten 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 vorne angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Mathias Schäfer und Prof. Hans-Günther Schmalz betreut worden.

.....
Köln, den

.....
Karin Peckelsen

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Katrin Peckelsen
Geburtsdatum: 21.04.1989
Geburtsort: Duisburg
Nationalität: Deutsch

Ausbildung

08/1999-07/2009 **Abitur**, Amplonius Gymnasium Rheinberg

10/2009-09/2014 **Studium**, Bachelor und Master of Science Chemie, Ruhr Universität Bochum

01/2012-04/2012 **Bachelor-Arbeit**, Ruhr Universität Bochum, in Kooperation mit der Firma Henkel Düsseldorf, Anleitung durch Dr. Peter Zinn. Arbeiten zum Thema „*Optimierung einer Methode zur schnellen Fettsäureanalytik mittels Gaschromatographie*“.

04/2014-09/2014 **Master Arbeit**, Ruhr Universität Bochum, in Kooperation mit der Firma Henkel Düsseldorf, Anleitung durch Prof. Dr. Christian Herrmann. Arbeiten zum Thema „*Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung von N-Nitrosodiethanolamin in Kosmetika mittels HPLC-MS/MS*“.

Seit 04/2015 **Doktorarbeit**, Universität zu Köln, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mathias Schäfer. Arbeiten zum Thema „*Strukturaufklärung komplexer Ionen in der Gasphase*“.