

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere

Charakterisierung nichtkovalenter  
Protein- und Peptid-Komplexe in der Gas-Phase

Linda M. M. Weigang

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. B. Küster

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. D. Langosch
2. Univ.-Prof. Dr. A. Kapurniotu

Die Dissertation wurde am 24.11.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 16.02.2009 angenommen.

## ***Meinen Liebsten***

Wirkliches Neuland in einer Wissenschaft kann wohl nur gewonnen werden, wenn man an einer entscheidenden Stelle bereit ist, den Grund zu verlassen, auf dem die bisherige Wissenschaft ruht, und gewissermaßen ins Leere zu springen.

*Werner Heisenberg*

## ***Ich danke***

Herrn Prof. Dr. Dieter Langosch und Herrn Dr. Thomas Letzel für die Überlassung des Projektes, die stetige Diskussionsbereitschaft, die uneingeschränkte Unterstützung während meiner gesamten Arbeit sowie die forscherschen Freiheiten.

Frau Prof. Dr. Aphrodite Kapurniotu für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit sowie Herrn Prof. Dr. Bernhard Küster für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Ulf Diederichen (Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Universität Göttingen) für die zahlreichen PNA Proben sowie FTICR Messungen, PD Dr. Dirk Schneider (Institut Biochemie und Molekularbiologie, Universität Freiburg) für die Bereitstellung der Cytochrom b<sub>559</sub> Mutanten sowie Dr. Erich Glawischnig und Dr. Verena Kriechbaumer (Lehrstuhl für Genetik, Technische Universität München) für die mir überlassene Mitarbeit am Tryptophan-Synthase-Projekt.

Louisa Mühlberger, Zhen Yang, Johanna Lampe und Tanja Köllmeier für ihre produktive Mitarbeit im Rahmen ihrer Praktika, Master- und Diplomarbeiten.

Ellen Schneider, Nicole Dennhart, Sylvia Große und Bernhard Poschner, welche mir in allen fachlichen sowie nicht fachlichen Lagen stets zur Seite standen.

allen Kolleginnen und Kollegen für die angenehme Arbeitsatmosphäre, stetige Hilfsbereitschaft und eine schöne Zeit.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei all meinen Freunden, insbesondere bei meinen Mädels, die mir mit vielen freudigen Abendstunden den nötigen Ausgleich zu dieser Arbeit verschafften.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre immerwährende Hilfe, unerschöpfliche Geduld sowie ihre liebevolle Unterstützung. Bei meinen Eltern möchte ich mich zudem für ihre finanzielle Unterstützung bedanken, ohne die diese Arbeit nie entstanden wäre.

Nicht zuletzt gilt mein Dank Eric, der mir in allen Lebenslagen stets zur Seite steht und mich durch seine mitreißende, positive Art und seiner Liebe immer aufs Neue begeistert und motiviert.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>1.1 PROTEINE UND PROTEIN-INTERAKTIONEN</b>	<b>2</b>
1.1.1 BEDEUTUNG	2
1.1.2 KLASSIFIZIERUNG VON PROTEINEN UND PROTEIN-KOMPLEXEN	3
1.1.3 KOMPLEX-INTERAKTIONEN	4
1.1.3.1 Oligomerisierungsmotiv	5
1.1.3.2 Oligomerisierung durch Funktionalisierung von Peptiden	8
1.1.3.3 Die Rolle der Hämgruppe bei Protein-Interaktionen	10
1.1.3.4 Enzyme und ihre Liganden	12
<b>1.2 MASSENSPEKTROMETRIE</b>	<b>13</b>
1.2.1 ELEKTROSPRAY-IONISIERUNG	14
1.2.2 QUADRUPOL-FLUGZEIT-MASSENSPEKTROMETER (Q-TOF)	15
<b>1.3 WEITERE UNTERSUCHUNGSMETHODEN FÜR PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN</b>	<b>17</b>
<b>2 ZIEL DER ARBEIT</b>	<b>19</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>20</b>
<b>3.1 ALLGEMEINE CHEMIKALIEN</b>	<b>20</b>
<b>3.2 MOLEKULARE SYSTEME</b>	<b>20</b>
<b>3.3 LIPIDE</b>	<b>20</b>
<b>3.4 METHODEN</b>	<b>21</b>
3.4.1 PROBENHERSTELLUNG	21
3.4.1.1 VSV-Peptide	21
3.4.1.2 Peptidnukleinsäuren	22
3.4.1.3 Cytochrom b <sub>559</sub> '-PsbF	22

3.4.1.4	Lysozym-Ligand und Cytochrom C-Ligandsysteme	23
3.4.1.5	Hämproteine	23
3.4.2	PEPTIDQUANTIFIZIERUNG	24
3.4.3	BESTIMMUNG DER SEKUNDÄRSTRUKTUR MITTELS ZIRKULAR DICHROISMUS	24
3.4.4	MS-MESSUNGEN	25
3.4.4.1	MS/MS-Messungen	26
3.4.4.2	Peptidmassen-Fingerabdruck – Peptide Mass Fingerprint	27
3.4.4.3	Kontinuierliche Flusssysteme (Continuous Flow)	28
3.4.4.4	Affinitätsstudien mittels Scatchard-Plot	30
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>KLASSISCHE CHARAKTERISIERUNG NICHTKOVALENTER KOMPLEXE</b>	<b>31</b>
4.1.1	NACHWEIS DES TRYPTOPHAN-SYNTASE-KOMPLEXES IN MAIS	31
<b>4.2</b>	<b>METHODENOPTIMIERUNG ZUR CHARAKTERISIERUNG NICHTKOVALENTER KOMPLEXE</b>	<b>34</b>
<b>4.3</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG VON PEPTID-PEPTID-INTERAKTIONEN</b>	<b>39</b>
4.3.1	HYDROPHOBE VSV-PEPTIDE	39
4.3.1.1	Design der VSV-Peptide	39
4.3.1.2	Konzentrationsabhängige Oligomerisierung	40
4.3.1.3	Lösemittelabhängige Peptideigenschaften	42
4.3.1.4	Helix-Helix-Interaktion in Abhängigkeit eines Sequenzmotivs	47
4.3.1.5	Peptid-Peptid-Interaktion in Liposomen	48
4.3.2	PEPTIDNUKLEINSÄUREN	51
4.3.2.1	Design der Peptidnukleinsäuren	51
4.3.2.2	Bestimmung der Sekundärstruktur der Peptidnukleinsäuren	52
4.3.2.3	Bevorzugte Strang-Orientierung der Peptidnukleinsäuren bei der Oligomerisierung	53
4.3.2.4	Sequenzspezifische Homo-Oligomerisierung	56
4.3.2.5	Sequenzspezifische Hetero-Oligomerisierung der Peptidnukleinsäuren	58
4.3.3	CYTOCHROM B' <sub>559</sub> -PEPTID	59
4.3.3.1	Design des Cytochrom b' <sub>559</sub> -Proteins	59
4.3.3.2	Einfluss des Häm-Cofaktors auf die Oligomerisierung	60
4.3.3.3	Sequenzabhängige Bindung des Cofaktors	61

<b>4.4</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG VON PROTEIN-LIGAND-INTERAKTIONEN</b>	<b>62</b>
4.4.1	PROTEIN-KOMPLEXE MIT VARIABLEN LIGANDEN	63
4.4.1.1	Komplexbildung in Abhängigkeit der Oligomerlänge	63
4.4.1.2	Komplexbildung in Abhängigkeit der Ligandkonzentration	65
4.4.1.3	Affinitätsbestimmung – $K_D$ -Wert	70
4.4.1.4	Kompetitive Komplexbildung	71
4.4.1.5	Spezifische und unspezifische Komplexbildung	73
4.4.2	KOMPLEXDISSOZIATION DURCH LÖSUNGSEINFLÜSSE	75
4.4.2.1	Komplexdissoziation durch Änderung des pH-Wertes	75
4.4.2.2	Ligand-Abspaltung durch den Einsatz von Denaturierungsreagenzien	78
<b>4.5</b>	<b>GAS-PHASEN-STABILITÄTEN</b>	<b>82</b>
4.5.1	GAS-PHASEN-STABILITÄTEN DER NIEDERMOLEKULAREN KOMPLEXE	82
4.5.1.1	Gas-Phasen-Stabilität der VSV-Homo-Dimere	83
4.5.1.2	Gas-Phasen-Stabilitäten der Peptidnukleinsäuren	83
4.5.1.3	Gas-Phasen-Stabilitäten der Cytochrom $b'_{559}$ -Komplexe	85
4.5.1.4	Zusammenfassung der Gas-Phasen-Stabilitäten niedermolekularer, nichtkovalenter Komplexe	85
4.5.2	GAS-PHASEN-STABILITÄTEN DER HÖHERMOLEKULAREN KOMPLEXE	86
4.5.2.1	Stabilitäten spezifischer und unspezifischer Komplexsysteme	86
4.5.2.2	Stabilitätsabnahme in Folge von Proteinentfaltungen	88
4.5.3	NORMIERUNG DER ERMITTELTEN GAS-PHASEN-STABILITÄTEN	90
4.5.3.1	Energieberechnungen für kovalente Bindungsbrüche	95
4.5.3.2	Energieberechnung für nichtkovalente Bindungsbrüche	97
4.5.4	FRAGMENTIERUNGSMUSTER	99
4.5.4.1	Unterschiedliche holo-Myoglobinformen	100
4.5.4.2	Peptidnukleinsäuren	102
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>105</b>
<b>5.1</b>	<b>SEQUENZABHÄNGIGE OLIGOMERISIERUNG</b>	<b>105</b>
5.1.1	GXXXG-MOTIV – OLIGOMERISIERUNGSMOTIV HYDROPHOBER PEPTIDE	105
5.1.2	OLIGOMERISIERUNG DER PEPTIDNUKLEINSÄUREN	108
5.1.3	HÄMBINDUNG UND COFAKTOR-INDUZIERTER OLIGOMERISIERUNG	111
5.1.4	CID-MESSUNGEN DER NIEDERMOLEKULAREN PEPTID-KOMPLEXE	112

<b>5.2</b>	<b>AUSBILDUNG VERSCHIEDENER PROTEIN-LIGAND-KOMPLEXARTEN</b>	<b>115</b>
5.2.1	HÖHERE OLIGOMERE	115
5.2.2	SPEZIFISCHE UND UNSPEZIFISCHE KOMPLEXBILDUNG	117
5.2.3	PROTEIN-KOMPLEXE IN VERSCHIEDENEN FALTUNGSZUSTÄNDEN	119
5.2.3.1	Native und entfaltete Protein-Komplexe	119
5.2.3.2	Teilentfaltete Komplexe	122
<b>5.3</b>	<b>GAS-PHASEN-BASIZITÄTEN</b>	<b>123</b>
<b>5.4</b>	<b>FLÜSSIG-PHASEN- UND GAS-PHASEN-VERHALTEN VON KOMPLEXEN</b>	<b>126</b>
5.4.1	PEPTIDEIGENSCHAFTEN	126
5.4.2	KOMPLEXSTABILITÄTEN	129
5.4.2.1	Energienormierung	129
5.4.2.2	Normierte Dissoziationsenergien	132
<b>5.5</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK</b>	<b>134</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>137</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>145</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>148</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>149</b>
	<b>Anhang</b>	<b>153</b>
	<b>Eigene Veröffentlichungen</b>	<b>162</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>164</b>

## Zusammenfassung

Proteine zählen aufgrund ihrer Vielfalt zu den Grundbausteinen des Lebens. Ihre vollständige Funktionalität erreichen sie oft erst durch die Zusammenlagerung mehrerer Proteine. Fehlerhafte Protein-Komplexbildungen sind häufig der Auslöser für Krankheiten, weshalb die Untersuchung nichtkovalenter Komplexe ein zentraler Bestandteil in der medizinischen, biologischen und der chemischen Forschung ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Charakterisierung verschiedener, nichtkovalenter Peptid- und Protein-Komplexe mit Hilfe der Massenspektrometrie durchgeführt. Der Einsatz einer schonenden Ionisationsmethode ermöglichte dabei den Transfer intakter, nichtkovalenter Komplexe in die Gas-Phase. Die massenspektrometrische Detektion bietet gegenüber herkömmlichen Untersuchungsmethoden den Vorteil, dass alle in der Lösung vorhandenen und geladenen Probenkomponenten simultan nachgewiesen werden können. Die massenspektrometrischen Untersuchungen trugen zur detaillierten Charakterisierung der Komplexbildung bei, welche sich durch bestimmte Aminosäuresequenzen oder durch die Peptid-Sekundärstruktur regulieren lässt. Protein-Ligand-Komplexe konnten mit Hilfe eines neuartigen, kontinuierlichen Flusssystems analysiert werden. Diese zeit- und materialsparende Technik erleichterte die Durchführung von Gradientenmessungen, wie z. B. Konzentrationsgradienten und brachte dadurch eine vereinfachte Untersuchungsmöglichkeit für höhere Komplexe mit sich. Unter Verwendung verschiedener Ligandsysteme wurden außerdem unterschiedliche Protein-Ligand-Komplexe detektiert, welche über Affinitäts- und Spezifitätsbestimmungen näher charakterisiert wurden.

Des Weiteren wurde der Einfluss von Lösemitteln bzw. Denaturierungsreagenzien untersucht. In diesen Studien ließen sich simultan gefaltete und teilentfaltete Komplexe beobachten. Die unterschiedlich gefalteten Komplexe konnte schließlich mit kollisions-induzierten Dissoziationen (CID) differenziert werden.

Die CID-Technik wurde weiterhin zur Bestimmung von Dissoziationsenergien genutzt. Eine Energienormierung ermöglichte die Berechnung von Dissoziationsenergien aus den E50%-Werten der Stabilitätsanalysen. Die erhaltenen Energiewerte konnten mit literaturbekannten Bindungsenergien verglichen werden. CID-Messungen wurden außerdem zur Aufklärung weiterer Proteineigenschaften herangezogen. Die detektierbaren Produktspektren konnten zur Untersuchung von Bindungsbrüchen, Oxidationszuständen und Gas-Phasen-Basizitäten eingesetzt werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen die vielseitigen Einsatzmöglichkeiten der CID-Technik, die unter Berücksichtigung der ermittelten Nachweisgrenze eine vielversprechende Untersuchungsmethode darstellt.



# 1 Einleitung

## 1.1 Proteine und Protein-Interaktionen

### 1.1.1 Bedeutung

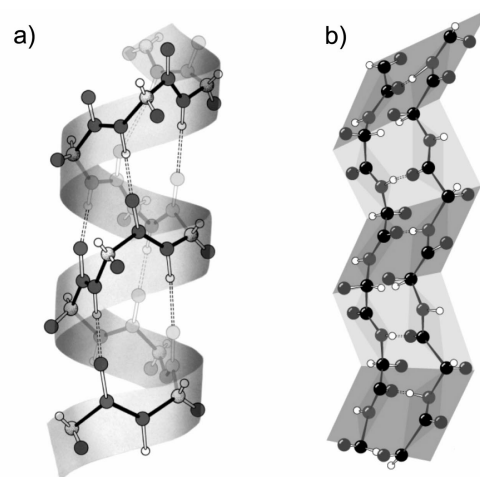
Das humane Genom besteht aus etwa 20'000-40'000 Genen, welche über 500'000 verschiedene Proteine kodieren [2]. Proteine zählen aufgrund ihrer vielseitigen Funktionalität zu den wichtigsten biologischen Molekülen. Dabei kontrollieren sie als Enzyme biochemische Reaktionen, fungieren als Hormone (extrazelluläre Signalmoleküle) und dienen zudem als Antikörper der körpereigenen Immunabwehr. Der Transport essentieller Substanzen in einem Organismus wird durch Transportproteine bewerkstelligt oder erleichtert. Hierbei sind insbesondere Ionenkanäle und Ionenpumpen zu nennen. Oft bestehen diese aus mehreren, zusammengelagerten Proteinen, welche aufgrund ihrer Funktion eine Pore durch eine Membran bilden. Die Oligomerisierung von Proteinen ist somit ein wesentlicher Bestandteil ihrer Funktionalität. Die Tatsache, dass über 80% der Proteine erst in ihrer komplexierten Form aktiv sind, zeigt, dass nicht nur die Primärstruktur eines Proteins die Wirkungsweise von Proteinen beeinflussen kann [2], sondern auch die Sekundär- und Tertiärstruktur – also die Faltung der Proteine. Schon geringe Umfaltungen der Proteinstruktur können Auslöser diverser Krankheiten sein. Eine durch pathogene Proteine (sog. Prionen) ausgelöste Fehlfaltung ist für das Auftreten von Amyloiderkrankungen wie Alzheimer und Creutzfeld-Jakob verantwortlich. Aufgrund der fehlerhaften Faltung aggregieren die pathogenen Proteine zu sogenannten Plaques, welche die pathologischen Kennzeichen dieser Erkrankungen darstellen. Während die Aminosäuresequenz der pathogenen Prionen in jedem Faltungszustand identisch ist, gibt es Krankheiten, die in Folge einer Punktmutation ausgelöst werden. So führt zum Beispiel der Austausch einer einzelnen Aminosäure in der  $\beta$ -Kette des Hämoglobins zu einer Konformationsänderung der Erythrozyten. Diese als Sichelzellanämie bekannte Krankheit kann zu multiplen Organveränderungen und -schäden führen [3].

Obwohl Proteine die Auslöser diverser Krankheiten darstellen, haben sie aufgrund ihrer hohen Funktionalität auch in der Arzneimittelforschung Einzug gehalten. In Form von Antibiotika dienen sie zum Beispiel als medizinische Wirkstoffe. Vor allem aber kommen sie als Diagnostika (wie Antikörper) sowie als Therapeutika (Interferone) und als Impfstoffe zum Einsatz.

Die vielfältige Funktionsweise, der Einfluss auf verschiedene Krankheiten aber auch der Einsatz als Medikament lassen Proteine zu interessanten Forschungsmolekülen werden. Die Beteiligung von Proteinaggregaten an biologischen Prozessen erfordert die detaillierte Untersuchung von Protein-Interaktionen. Die Funktionalität der Proteine wird häufig über deren Struktur bestimmt, anhand derer Proteinklassifizierungen vorgenommen werden können.

### 1.1.2 Klassifizierung von Proteinen und Protein-Komplexen

Die Klassifizierung von Proteinen kann auf unterschiedliche Arten erfolgen – meist jedoch spielen Verwandtschaftsbeziehungen untereinander eine entscheidende Rolle. Die gegenwärtig in der PDB-Datenbank registrierten Proteine werden in Strukturdatenbanken wie CATH (*classification by class, architecture, topology and homology*) und SCOP (*structural classification of proteins*) hinsichtlich ihrer Struktur klassifiziert. Die räumliche Anordnung von Proteinen wird durch die Sekundärstruktur beschrieben. Im Wesentlichen unterscheidet man hierbei zwischen  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern, deren Struktur jeweils in Abb. 1 dargestellt ist.



**Abb. 1: Mögliche Sekundärstrukturelemente einer Polypeptidkette.** a) Schematische Darstellung einer  $\alpha$ -Helix, welche über  $n, n+4$  intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird. b) Schematische Darstellung des  $\beta$ -Faltblatts, einer Struktur, in welcher zwei  $\beta$ -Stränge entweder parallel oder antiparallel angeordnet sind und ebenfalls über Wasserstoffbrücken miteinander interagieren. Abbildungen aus [4].

Die  $\alpha$ -helikale Peptidkette besitzt die Form einer Spirale, welche pro Windung eine durchschnittliche Anzahl von 3,6 Aminosäuren aufweist. Die Ganghöhe einer Windung ( $p$ ) umfasst dabei 0,54 nm [5]. Stabilisiert wird die Helix über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen jeder vierten Aminosäure. Dabei interagiert der Carbonylsauerstoff der  $n$ -ten Aminosäure mit dem Amidproton der  $(n+4)$ -ten Aminosäure derselben Polypeptidkette. Das  $\beta$ -Faltblatt wird ebenfalls über Wasserstoffbrücken stabilisiert. Diese bilden sich entlang des Polypeptidrückgrats zwischen zwei  $\beta$ -Strängen aus, wobei die paarenden Stränge einen Abstand von etwa 7,0 Å einnehmen [5]. Häufig werden die  $\beta$ -Faltblätter über  $\beta$ -Schleifen miteinander verbunden. Es existieren jedoch auch Bereiche, die keine definierten Struktureinheiten aufweisen – diese werden als Zufallsknäuel bezeichnet.

Die nächste Stufe der Proteinstruktur wird über die Tertiärstruktur bestimmt. Sie legt die dreidimensionale Struktur, die Konformation der Proteine, fest. Meist entstehen dabei globuläre oder faserförmige Proteine, welche über Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Wechselwirkungen sowie Disulfidbrücken stabilisiert werden. Ähnliche Interaktionen kommen

zustande, wenn sich die Quartärstruktur der Proteine ausbildet und sich mehrere Polypeptidstränge zusammenlagern.

### 1.1.3 Komplex-Interaktionen

Stabilisiert werden Protein-Protein- sowie Protein-Ligand-Komplexe meist über nichtkovalente Wechselwirkungen, von denen die ionische Coulomb-Wechselwirkung die stärkste Interaktion darstellt. Da sich diese zwischen zwei Ladungen ( $Q_1$  und  $Q_2$ ) ausbildet, kann die Wechselwirkung je nach Art der Ladungen sowohl anziehende als auch abstoßende Eigenschaften aufweisen. Ihre Energie wird durch Formel (1) ausgedrückt, welche die Abhängigkeit vom Abstand ( $r$ ) der beiden Interaktionspartner verdeutlicht. Je größer ihr Abstand voneinander, desto schwächer ist die zwischen ihnen entstehende Wechselwirkung.

$$E = \frac{Q_1 Q_2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 r^2} \quad (1)$$

Der ebenfalls antiproportionale Einfluss der Dielektrizitätskonstante ( $\epsilon$ ) gibt einen Hinweis auf unterschiedliche Stärken der ionischen Wechselwirkung in Abhängigkeit des Mediums. In Medien mit geringen Dielektrizitätskonstanten ist die Coulomb-Wechselwirkung stärker ausgeprägt als in Medien mit großen Dielektrizitätskonstanten. Wasser weist mit  $\epsilon = 79$  eine hohe Dielektrizitätskonstante auf, weshalb in wässrigen Lösemitteln die ionischen Wechselwirkungen einen Energiebeitrag von etwa 3-4 kcal/mol liefern [6]. Im Vakuum, dessen Dielektrizitätskonstante auf 1 normiert ist, kann die Bindungsenthalpie von ionischen Bindungen bis auf 80 kcal/mol gesteigert werden [7].

Die zweitstärkste, nichtkovalente Wechselwirkung zur Stabilisierung der Protein-Komplexe ist die Wasserstoffbrücke, welche in wässrigen Lösemitteln eine Bindungsenthalpie von etwa 0,5-1,4 kcal/mol aufweist [6]. Sie bildet sich zwischen zwei elektronegativen Atomen aus, von denen eines über ein kovalent gebundenes Proton verfügt (Donoratom), um welches das zweite, elektronegative Atom (Akzeptoratom) konkurriert.

Van-der-Waals Wechselwirkungen stellen eine weitere Gruppe der nichtkovalenten Wechselwirkungen dar. Sie zählen mit etwa 1 kcal/mol zu den schwächsten Interaktionen zwischen den Proteinen. Ihre Stärke hängt mit der sechsten Potenz vom Abstand der Interaktionspartner ab. Dadurch nehmen nur eng benachbarte Atome an diesen Interaktionen teil. Trotzdem liefern gerade die hydrophoben Wechselwirkungen einen wichtigen Beitrag zur Oligomerisierung von Proteinen. Hydrophobe, unpolare Seitenketten neigen in wässrigen, polaren Lösemitteln zur Zusammenlagerung, um die Kontaktfläche mit den Lösemittelmolekülen zu verkleinern. Aufgrund der dichten Packung in der Protein-Protein-Kontaktfläche treten die hydrophoben Wechselwirkungen sehr kompakt auf, was sie zur treibenden Kraft bei der Oligomerisierung werden lässt.

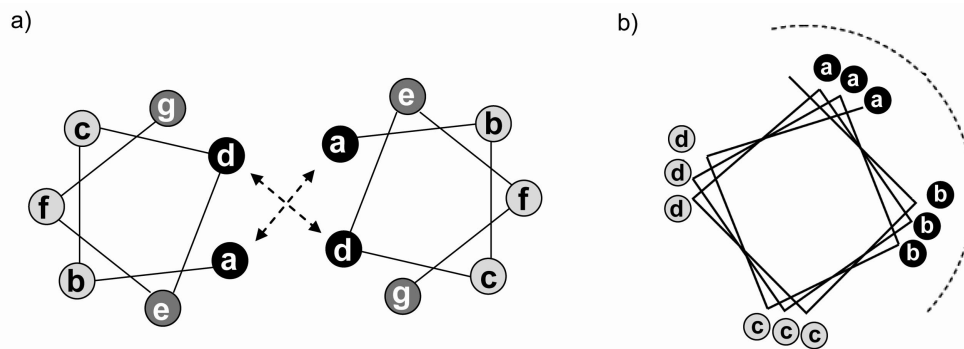
Die Ausbildung der beschriebenen Wechselwirkungen erhöht in Folge einer Oligomerisierung den Enthalpiebetrag der molekularen Systeme. Entropisch sind durch die Oligomerisierung starke Einbußen zu akzeptieren. Das Proteinrückgrat einer Polypeptidkette kann in der Flüssig-Phase besonders im ungefalteten Zustand zahlreiche Konformationen einnehmen. Eine Zusammenlagerung zweier Polypeptidketten zwingt diese in eine bestimmte Konformation, wodurch die Entropie des Systems verringert wird. Gleiches gilt für die in der Kontaktfläche lokalisierten Aminosäuren bzw. für deren Seitenketten. Die möglichen Rotamere der Seitenketten werden bereits über die Faltung der Proteine eingeschränkt, durch die Oligomerisierung zusätzlich zu einer bestimmten rotameren Form gedrängt. Dies gilt insbesondere für lösliche Proteine. Membranproteine besitzen aufgrund ihrer Membranverankerung bereits eine stark eingeschränkte Konformation, welche sich durch den Einfluss der Lipidmoleküle ausbildet. Der Entropieverlust löslicher Proteine neutralisiert häufig den gesamten Enthalpiegewinn, welcher durch die stabilisierenden Wechselwirkungen zustande kommt. Dies kann durch einen Entropiegewinn aufgrund des hydrophoben Effekts wieder ausgeglichen werden [8]. Er stellt die eigentliche Triebkraft der Oligomerisierung dar und bewirkt die bereits beschriebene Zusammenlagerung apolarer Proteinflächen in einem wässrigen Medium. Die dadurch bedingte Oberflächenverkleinerung reduziert die Protein-Wasser-Kontaktfläche, wodurch sich die geordneten Strukturen des Wassers, die sich entlang der Proteinoberfläche ausbilden, ebenfalls reduzieren. Die gewonnene Entropie des Wassers erhöht dadurch die Gesamtentropie des Systems, obwohl die Proteine selbst einen Entropieverlust durch die Zusammenlagerung erleiden. Die Interaktion von Proteinen wird somit maßgeblich von der Proteinumgebung beeinflusst. Bei Membranproteinen übernimmt diese Funktion die Lipidschicht. Der solvophobe Effekt sorgt dafür, dass bevorzugt Lipid-Lipid- und Helix-Helix-Wechselwirkungen ausgebildet werden. Es wird jedoch auch postuliert, dass sich Lipide in die Interaktionsfläche interkalieren und so als eine Art Klebstoff die Protein-Zusammenlagerung begünstigen. Die kooperative Wirkung von Lipiden wie z. B. von Cholesterin und Palmitinsäure, konnte 1997 anhand der Kristallstruktur eines synthetischen Adrenalin G Rezeptor Proteins gezeigt werden [9].

Die Zusammenlagerung von Proteinen und die sich dadurch ausbildenden Wechselwirkungen werden unter anderem von der Aminosäuresequenz beeinflusst. Besonders spezielle Abfolgen in der Aminosäuresequenz, sogenannte Motive, begünstigen die Ausbildung von Oligomeren.

#### *1.1.3.1 Oligomerisierungsmotiv*

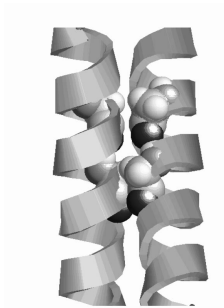
Protein-Protein- und Protein-Ligand-Interaktionen können über die Erkennung spezieller Aminosäuremotive ausgelöst werden. In Datenbanken wie SCANSITE und PROSITE sind ca. 200 lineare, funktionelle Motive katalogisiert [10]. Eines der bekanntesten Oligomerisierungs-Sequenzmotive ist das Coiled-Coil-Motiv. Seine Aminosäuresequenz lässt sich in ein

Heptadenmuster  $[abcdefg]_n$  einordnen, in welchem die Aminosäuren in a- und d-Position hydrophober, unpolarer Natur sind (Abb. 2 a) [11]. Diese Aminosäuren positionieren sich auf einer Seite einer helikalen Struktur, wodurch die Helices in einem positiven Kreuzungswinkel ( $\Omega > 0$ ) über hydrophobe Wechselwirkungen miteinander interagieren können. Die e- und g-Positionen werden häufig von geladenen Aminosäuren besetzt, welche über elektrostatische Wechselwirkungen ebenfalls miteinander interagieren können [11].



**Abb. 2: Schematische Darstellung möglicher Interaktionsmotive.** a) Heptadenmotiv  $[abcdefg]_n$ . b) Tetradenmotiv  $[abcd]_n$ . Die schwarz markierten Aminosäurepositionen befinden sich in der Interaktionsfläche zweier Helices und sind an der Helixinteraktion beteiligt. Abbildungen verändert nach [12, 13].

Eines der meist untersuchten Peptide hinsichtlich interagierender Helices ist sicherlich das Glykophorin A (GpA), ein integrales Membranprotein der Erythrozyten. Durch Mutationsanalysen konnte eine Sequenzabfolge von sieben Aminosäuren (LlxxGVxxGVxxT) als Oligomerisierungsmotiv identifiziert werden [14-18]. Das Motiv gleicht hinsichtlich der hydrophoben Aminosäuren, welche jede vierte Position einnehmen, dem Heptadenmotiv. Die beiden interagierenden Helices kreuzen sich jedoch mit einem negativen Kreuzungswinkel ( $\Omega < 0$ ) – man spricht von rechtshändigen Helix-Helix-Paaren. Diese werden durch das Tetradenmotiv  $[abcd]_n$  charakterisiert (Abb. 2 b). Über *in vitro* Techniken wie Analytische Ultrazentrifugation [19], native Gel-Elektrophorese [18], Förster Resonanz Energie Transfer [20] und Versuche mit Röntgenkleinwinkelstreuung [21] konnte die Dimerisierung von Glykophorin A charakterisiert werden. Auch *in vivo* Systeme wie zum Beispiel das ToxR- [16] oder GALLEX-System [22, 23] trugen zur weiteren Charakterisierung bei. Es zeigte sich, dass sich das 7-Aminosäuremotiv im Wesentlichen auf das zentrale GxxxG-Motiv beschränken lässt [13]. Abb. 3 verdeutlicht die Zusammenlagerung der beiden Helices eines Glykophorin A-Peptids. Die kleinen Glycinreste, welche keine Seitenketten aufweisen, erlauben aufgrund ihrer Position in der Kontaktfläche eine optimale Annäherung der Helices, wodurch die Oligomerisierung unterstützt wird. Festkörper- und Flüssig-NMR-Untersuchungen trugen dazu bei, die Interaktionsfläche und die stabilisierenden Wechselwirkungen des Glykophorins genauer zu charakterisieren [15, 24]. Durch Punktmutationen eines oder beider Glycinreste konnte eine deutliche Abnahme der Oligomerisierung verzeichnet werden [16, 18, 23, 25, 26], was die Wichtigkeit des GxxxG-Motivs hinsichtlich der Oligomerisierung hervorhebt.



**Abb. 3: Strukturmodell der dimeren Transmembrandomäne des Glykophorin A.** Die beiden Glycinreste sind als voluminöse Kugeln dargestellt, wodurch deren Lage in der Interaktionsfläche verdeutlicht wird. Durch die fehlenden Seitenketten kann eine optimale Annäherung der Helices stattfinden und so die Oligomerisierung begünstigt werden. Das Modell basiert auf der pdb-Struktur 1AFO und wurde mit der Software RasWin Molecular Graphics (Version 2.7.3.1.) erstellt.

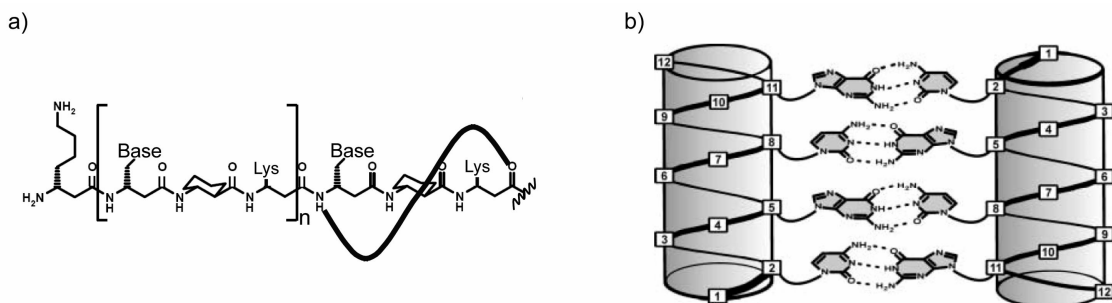
Eine andere Transmembrandomäne (TMD) mit GxxxG-Aminosäuresequenzmotiv befindet sich im membranassoziierten Glyko-Protein (G-Protein) des *Vesicular Stomatitis Virus (VSV)* [27, 28]. Dieses als Trimer aktive Protein ist der Auslöser einer Viruserkrankung (Vesikulärstomatitis) bei Huftieren, welche durch die Fusion von viraler und zellulärer Membran hervorgerufen wird. Durch Mutationen im GxxxG-Motiv konnte eine Abnahme dieser Fusogenität verzeichnet werden [29]. Auch die Oligomerisierung der VSV-Transmembrandomäne lässt sich durch Mutationen des GxxxG-Motivs beeinträchtigen, wie dies anhand von *in vivo* Versuchen mit dem ToxR-System gezeigt werden konnte [30].

Die Erforschung des GxxxG-Motivs ist gerade in der Medizin von zentraler Bedeutung, da auch Erkrankungen wie Alzheimer durch die Aggregation von Amyloid-Peptiden und die Bildung von Plaques im Gehirn hervorgerufen werden, welche mit dem GxxxG-Motiv zusammenhängen. Die Proteinvorstufe der pathogenen Peptide ist das *Amyloid Precursor Protein (APP)*, welches drei GxxxG-Motive aufweist. Es wird von proteinspaltenden Enzymen (Sekretasen) zu kürzeren Fragmenten, den  $\beta$ -Amyloiden ( $A\beta$ ), gespalten. Das aus 42 Aminosäuren bestehende Fragment trägt maßgeblich zur Cytotoxizität und der Ansammlung von Amyloid-Plaques bei alzheimererkrankten Patienten bei. Es entsteht in der Regel aus dem APP-Dimer, welches sich aufgrund des  $G_{29}xxxG_{33}$ -Motivs ausbildet. Durch Mutationen dieser Glycinreste kann die Dimerisierung unterdrückt und so die Bildung kürzerer Fragmente ausgelöst werden. In Folge dessen wird die Entstehung des pathogenen  $A\beta$ -42 reduziert [31]. Moleküle wie NSAIDs, welche mit dem GxxxG-Motiv interagieren, könnten die Oligomerisierung und infolge dessen die Bildung des  $A\beta$ -42 unterdrücken. Sie könnten bei Alzheimer-Patienten als Therapeutika eingesetzt werden [31-34].

### 1.1.3.2 Oligomerisierung durch Funktionalisierung von Peptiden

Die Interaktion von Proteinen kann auch durch die Funktionalisierung von Aminosäuren, zum Beispiel durch Nucleobasen, gesteuert werden. Durch den gezielten Einbau von Nucleobasen kann über die Ausbildung von Watson-Crick-Basenpaarungen eine Oligomerisierung zweier Proteine oder Peptide herbeigeführt werden. In ihrem Aufbau gleichen die Peptidnucleinsäuren einer DNA, in welcher das Zuckerphosphatrückgrat durch ein ungeladenes Peptidrückgrat ersetzt wurde. Aufgrund ihres Aufbaus und der Fähigkeit, Watson-Crick-Basenpaarungen auszubilden, gelten sie als DNA-nachahmende Konstrukte. Sie werden als Vorstufen von Makromolekülen diskutiert und dienen als synthetische Peptide hervorragend der Charakterisierung nichtkovalenter Komplexe [35].

Peptidnucleinsäuren (PNAs) bestehen, anders als herkömmliche Peptide, aus C3-substituierten Aminosäuren, den  $\beta$ -Aminosäuren. Um eine stabile Sekundärstruktur auszubilden, werden sechs  $\beta$ -Aminosäuren benötigt. Diese formen eine als 14-Helix bezeichnete Struktur, welche im Peptidrückgrat über einen 14-gliedrigen Ring Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet (Abb. 4 a). Eine Helixwindung umfasst, anders als bei einer herkömmlichen  $\alpha$ -Helix, nur 3 Aminosäuren. Folglich positioniert sich jeder dritte Rest auf der gleichen Helixflanke. Dies macht man sich bei der Einführung der Nucleobasen zu Nutze, welche die Peptidkette funktionalisieren. Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin werden als Erkennungseinheiten an jeder dritten Position eingebracht, wodurch eine Oligomerisierung über die Ausbildung von Watson-Crick-Basenpaarungen ermöglicht wird (Abb. 4 b).

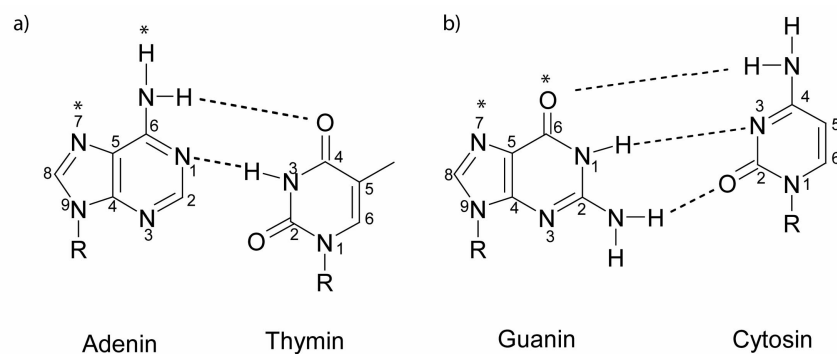


**Abb. 4: Schematischer Aufbau der Sekundär- und Quartärstruktur von Peptidnucleinsäuren.** a) Aufbau einer 14-Helix. b) Struktur eines Dimers von Peptidnucleinsäuren. Die Helices zweier PNAs können über die Nucleobasen untereinander Watson-Crick-Basenpaarungen ausbilden. Abbildungen verändert nach [36, 37].

Kristall- und NMR-Strukturen konnten die Ausbildung von Homo- und Hetero-Dimeren sowie Hetero-Trimeren bestätigen. Die Struktur der PNA-Dimere gleicht allerdings nicht der gängigen A- oder B-Form, wie sie von RNA- oder DNA-Molekülen bekannt ist, sondern sie bilden bevorzugt eine P-förmige Helix mit einer Helixweite von 28 Å und einer Ganghöhe von 18 Basenpaaren [38, 39].

Diederichsen *et al.* konnten anhand von temperaturabhängigen UV-Absorptionen mögliche Paarungen und Stabilitäten verschiedener Peptidnukleinsäuren untersuchen. Ähnlich wie bei DNA-Schmelzkurven geht die Dissoziation des Doppelstrangs mit der Entstapelung der Nukleobasen einher. Dies wird mittels UV/Vis-Spektroskopie durch einen sigmoidalen Anstieg der Absorption bei zunehmender Temperatur (Hyperchromie) beobachtet [36, 40]. Werden unterschiedliche Nukleobasen in die Sequenzen der PNAs eingebaut, welche unter Ausbildung komplementärer Paarungen interagieren können, erhält man Oligomere unterschiedlicher Stabilität. Die von Diederichsen *et al.* durchgeführten Schmelzexperimente zeigten in Abhängigkeit von möglichen komplementären Basenpaarungen unterschiedliche Stabilitäten für verschiedene PNA-Dimere.

Die Dissoziation von DNA-Duplexen in der Gas-Phase korreliert hinsichtlich der ermittelten Stabilität mit der Anzahl der vorhandenen Wasserstoffbrückenbindungen [41]. Die Struktur der PNAs weist eine lineare Form auf, wodurch neben Watson-Crick-Basenpaarungen, wie sie bei DNA-Strukturen bekannt sind, auch Purin-Purin- sowie Pyrimidin-Pyrimidin-Wechselwirkungen ausgebildet werden können. Purine besitzen mit dem Stickstoffatom N7, welches nicht an der Ausbildung von Watson-Crick-Basenpaarungen teilnimmt, eine weitere Bindungsmöglichkeit. Eine Basenpaarung über diese Bindungsseite ist als Hoogsteen-Modus bekannt (Abb. 5). Sowohl von der Watson-Crick- als auch der Hoogsteen-Paarung können sich reverse Bindungsmodi ausbilden. Bei diesen Paarungen wird eine der beiden Nukleinbasen gespiegelt. Insgesamt liegen somit vier mögliche Paarungsmodi vor.



**Abb. 5: Nukleobasen mit möglichen Basenpaarungen.** Die kanonische Watson-Crick-Basenpaarung erfolgt a) durch die Ausbildung zweier Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Adenin und Thymin und b) durch die Ausbildung dreier Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Guanin und Cytosin. Die mit \* gekennzeichneten Positionen geben die Hoogsteen-Bindungsstellen an.

Weiß und Diederichsen zeigten 2007, dass sich die Interaktionen der Peptidnukleinsäuren in drei Gruppen einteilen lassen: a) unspezifische Interaktionen: A-A, C-C, G-G und A-C, b) spezifische Basenpaarungen in Bezug auf den Watson-Crick-Modus: A-T, T-T, C-C<sup>+</sup>, T-C und T-G und c) im Falle der mit Guanin funktionalisierten Oligomere ausschließlich Homo-Oligomerisierungen [42]. Die reine Homo-Oligomerisierung der guaninreichen Sequenzen deckt sich mit der Kenntnis, dass



diese speziell höhere Oligomere sogenannte Quadruplexe ausbilden, die in der Regel höhere Stabilitäten aufweisen [36, 43].

Über die funktionalisierten Seitenketten der Peptidnukleinsäuren können molekulare Erkennungs- und Bindungsprozesse anhand von synthetisch hergestellten Molekülen untersucht werden. Ihnen kommt besonders bei katalytischen Prozessen sowie in der Proteinfaltung eine bedeutende Rolle zu. Des Weiteren stehen die von Nielsen [44] eingeführten Peptide im Zentrum der medizinischen Forschung. Während sie einst als Hoffnungsträger der Antisense Therapie galten, sind sie in der Bioanalytik insbesondere in der Diagnostik nicht mehr wegzudenken. So kommen sie bei der *in situ* Hybridisierung und bei PCR basierenden Systemen zum Einsatz. Die Anwendung in der Antisense Therapie, in welcher sich synthetisch hergestellte DNA- oder RNA-Sequenzen an eine fehlerhafte, zelleigene mRNA heften, um die Bildung von fehlerhaften Proteinen zu inhibieren, schlug aufgrund der hohen Selbstaggregation fehl. Die geringe Zellgängigkeit und eine schlechte Wasserlöslichkeit sind weitere Gründe für den Misserfolg. Die vielversprechende Einsatzmöglichkeit der Peptidnukleinsäuren bei der Behandlung von Viruserkrankungen wie Hepatitis C, HIV-Infektionen und Influenza ließen sie in jüngster Zeit wieder zu wichtigen Versuchsobjekten in der Forschung werden. Erst kürzlich konnte eine französische Forschungsgruppe die Inhibierung des Hepatitis C Virus an der inneren, ribosomalen Eintrittsstelle mittels kurzkettiger PNAs durchführen [45].

#### 1.1.3.3 Die Rolle der Hämgruppe bei Protein-Interaktionen

Das Hämmolekül ist ein eisenhaltiger Porphyrin-Komplex, der sich als Ligand an Proteine binden oder auch als Cofaktor die Interaktion zweier Proteine herbeiführen kann. Aufgebaut ist der Porphyrin-Komplex aus vier Pyrrolringen (Tetrapyrrol), welche über Methingruppen zyklisch miteinander verbunden sind. Das zentrale Eisenatom ist über vier koordinative Bindungen im Porphyrinring verankert. Zwei weitere Bindungen kann das Atom mit einer Polypeptidkette oder mit anderen Liganden eingehen. In den bekannten Häm-Komplexen, wie Myoglobin und Hämoglobin, interagiert das Häm nichtkovalent mit Histidinresten des Proteins. Dabei kann die Hämgruppe mit dem proximalen Histidin direkt Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Mit dem distalen Histidin auf der anderen Ebene des Porphyrinrings wird dafür ein vermittelnder Ligand (z. B. Sauerstoff) benötigt.

Ein weiteres Protein, welches nichtkovalent mit einer Hämgruppe wechselwirkt, ist das Cytochrom  $b_{559}$ . Dieses Protein ist ein Teil des Photosystems II von Pflanzen und Cyanobakterien. Es besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, welche die Membran jeweils einmal durchspannen. *In vivo* werden heteromere Komplexe aus beiden Untereinheiten ausgebildet, in welche Häm interkaliert werden kann. Die Bindung des Häms erfolgt auch in diesem Falle über Histidinreste, welche als axiale Liganden fungieren. Dies konnte über Elektronen-Paramagnetische Resonanz sowie Resonanz-Raman-Spektroskopie herausgefunden werden [46]. *In vitro* Studien

zeigten, dass sich auch Homo-Dimere der beiden Untereinheiten ausbilden können [47]. Die Forschungsarbeiten von Francke *et al.* wiesen auf die Notwendigkeit der Hämgruppe als Cofaktor bei der Oligomerisierung der Peptide hin [48]. Dabei war auch der Oxidationszustand des zentralen Eisenatoms von besonderer Bedeutung. Schneider *et al.* hingegen zeigten, dass die Ausbildung der Homo-Dimere auch ohne Anwesenheit eines Hämmoleküls erfolgt [49, 50]. Außerdem konnte das in der Position 18 enthaltene Arginin der  $\beta$ -Untereinheit als weitere Hämbindungsstelle identifiziert werden. Eine Mutation zu Alanin unterdrückte die Hämbindung, beeinflusste die Oligomerisierung des Peptids jedoch nicht [49].

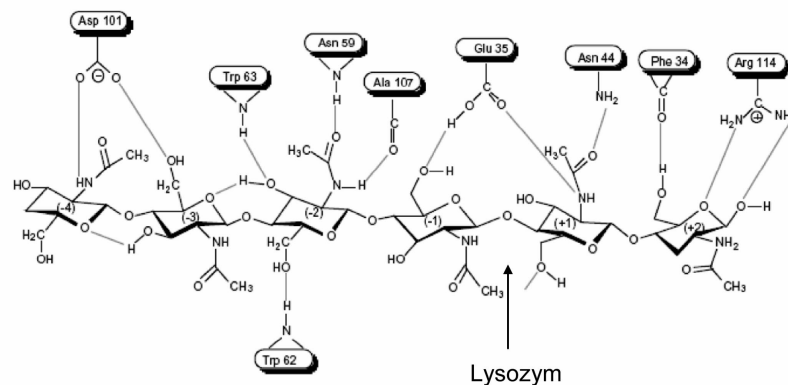
Dem gegenüber stehen die Protein-Komplexe, welche Häm als Ligand binden, ohne dass eine Oligomerisierung eingeleitet wird. Das freie Protein wird definitionsgemäß als apo-Protein bezeichnet, die mit Häm komplexierte Form als holo-Protein. Die Bindung der Hämgruppe erfolgt im Falle des Myoglobin- und Hämoglobin-Komplexes über nichtkovalente Bindungen. Häm kann allerdings auch, wie dies beim Cytochrom C der Fall ist, über kovalente Thioetherbrücken an zwei Cysteinreste mit dem Polypeptidstrang verankert werden. Die holo-Komplexe von Myoglobin und Cytochrom C bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette, an welche ein Hämmolekül gebunden ist. Hämoglobin dagegen setzt sich aus vier Untereinheiten ( $\alpha\beta\beta$ ) zusammen, von denen jede aus einer Polypeptidkette und einem Hämmolekül aufgebaut ist. Zwei der Untereinheiten sind jeweils identisch, weshalb es zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Untereinheiten gibt.

Myoglobin wurde bereits in den Anfängen der Massenspektrometrie als Modellsystem entdeckt und wurde daher in den vergangenen Jahren sehr intensiv untersucht. Die ersten Versuche, holo-Myoglobin über eine Elektrosprayquelle intakt in die Gas-Phase zu überführen und mit einem Quadrupol-Massenfilter zu identifizieren, wurden 1991 von Katta und Chait durchgeführt [51]. Die Detektion von intaktem und stabilem holo-Myoglobin in der Gas-Phase ermöglichte einige Jahre später die Untersuchung der Gas-Phasen-Stabilität der Hämbindung mittels Dissoziationsmessungen. IR-Photodissoziationsmessungen (*black body infrared radiative dissociation* – BIRD) von  $\alpha$ -Hämoglobin folgten wenige Jahre später [52, 53]. Dabei konnte die Dissoziation von geladenem Häm sowie ungeladenem Häm wahrgenommen werden. Diese Beobachtung schien jedoch geräteabhängig zu sein. Experimente mit Triple-Quadrupol-Geräten zeigten bevorzugt die Abspaltung von 1-fach geladenem Häm. Zu geringen Anteilen konnte auch ungeladenes Häm nachgewiesen werden [54, 55]. MS/MS-Untersuchungen mit reduzierten Myoglobinlösungen zeigten die Abspaltung von ungeladenem Häm [1]. Diese unterschiedliche Hämabspaltung konnte letztendlich darauf zurückgeführt werden, dass zwei verschiedene holo-Protein-Komplexe in Abhängigkeit vom Oxidationszustand des zentralen Eisenatoms existieren. Die beiden Propiongruppen des Porphyrinrings sind in Lösung negativ geladen, wobei dem System eine Nettoladung von -2 zukommt. Bindet ein  $\text{Fe}^{3+}$  an den Porphyrinring, so beträgt die Nettoladung des Hämmoleküls +1. Diese Hämform wird Ferri-(III)-Form genannt. Bindet hingegen die reduzierte  $\text{Fe}^{2+}$ -Form, so ist die Nettoladung der Hämgruppe Null, was durch die Ferro-(II)-Form repräsentiert wird.

### 1.1.3.4 Enzyme und ihre Liganden

Neben den Peptid-Peptid- und Protein-Ligand-Komplexen stellen auch die Enzym-Ligand-Komplexe eine wichtige Gruppe innerhalb der nichtkovalenten Komplexe dar. Wird als Ligand das Substrat des Enzyms verwendet, so können spezifische Protein-Ligand-Komplexe beobachtet werden, in welchen das Substrat im aktiven Zentrum des Proteins bindet. Die Lebensdauer dieser Komplexe wird durch die Geschwindigkeitsrate des Substratabbaus bestimmt, weshalb Enzym-Substrat-Komplexe oft sehr kurzlebig sind. Anders verhält es sich mit Enzym-Inhibitor-Komplexen. Ähnlich wie das Substrat bindet ein Inhibitor an das aktive Zentrum des Enzyms, wird aber im Gegensatz zum Substrat nicht von diesem abgebaut. Da der Inhibitor und das Substrat an der gleichen Bindungsstelle binden, konkurrieren diese um das gleiche aktive Zentrum – man spricht von einer kompetitiven Inhibierung. In Abhängigkeit der vorliegenden Konzentration können sich die Liganden gegenseitig aus der hydrophoben Tasche des Enzyms verdrängen.

Lysozym stellt zusammen mit dem Substrat  $\text{GlcNAc}_6$  bzw. dem Inhibitor  $\text{GlcNAc}_3$  ein solches Protein-Ligandsystem dar. Der Mechanismus des Substratabbaus ist durch die bekannte Kristallstruktur weitestgehend verstanden [56-58]. Als Glykosidase ist Lysozym in der Lage, glykosidische Bindungen zu spalten, wie sie zum Beispiel in der Mureinschicht der Zellwände von Gram-positiven Bakterien vorkommen. Diese Schicht ist aus  $\beta$ -1,4-glykosidisch verknüpften Aminosacchariden, dem N-Acetylglucosamin  $\text{GlcNAc}$  und der N-Acetylmuraminsäure (MNAc), aufgebaut und kann von Lysozym abgebaut werden. Die von Lysozym katalysierte Reaktion, eine Hydrolyse, erfolgt im aktiven Zentrum, einem hydrophoben Spalt des Proteins, welches über insgesamt sechs Bindungsstellen  $(-4)(-3)(-2)(-1)(+1)(+2)$  verfügt. Das Substrat  $\text{GlcNAc}_6$ , ein Oligosaccharid des Chitins, kann an alle sechs Bindungsstellen nichtkovalent über Wasserstoffbrückenbindungen komplexiert und abgebaut werden (Abb. 6). Dabei erfolgt die Spaltung zwischen den Bindungsstellen  $(-1)$  und  $(+1)$ . Als Hauptprodukte entstehen  $\text{GlcNAc}_2$  und  $\text{GlcNAc}_4$ . Die Hydrolyse lässt sich durch die kürzerkettigen Oligosaccharide  $\text{GlcNAc}_2$  und  $\text{GlcNAc}_3$  inhibieren. Sie binden ebenfalls an das aktive Zentrum und blockieren so die Bindestelle.



**Abb. 6:** Das Hexasaccharid des Chitins  $\text{GlcNAc}_6$  bindet über Wasserstoffbrückenbindungen im aktiven Zentrum an Lysozym. Durch Hydrolyse wird die  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindung zwischen  $(-1)$  und  $(+1)$  gespalten, wobei  $\text{GlcNAc}_4$  und  $\text{GlcNAc}_2$  als Hauptprodukte entstehen. Abbildung verändert nach [59].

In der Regel haben kürzerkettige Oligosaccharide eine geringere Affinität. Aufgrund der kürzeren Kettenlänge sind weniger Acetylgruppen vorhanden, welche dem Liganden die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu Lysozym ermöglichen. Bestätigt wurde dies bereits in den sechziger Jahren von Dahlquist *et al.* sowie in den Siebziger Jahren von Schindler *et al.*, welche mit UV- und Fluoreszenz-Titrationsmessungen die Assoziationskonstanten verschiedener Liganden bestimmt haben [60, 61]. Die massenspektrometrische Bestimmung der Dissoziationskonstanten in der Gas-Phase wurde im Rahmen der Dissertation von Nicole Denhart für die Komplexe [Lys(GlcNAc<sub>2</sub>)] und Lys(GlcNAc<sub>3</sub>) an einem Time-of-Flight Gerät bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die ermittelten Gas-Phasen-K<sub>D</sub>-Werte in diesem Modell mit denen der Flüssig-Phase übereinstimmen [62].

## 1.2 Massenspektrometrie

Die Vielzahl der etablierten Techniken zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen und zur Charakterisierung von Protein-Komplexen spiegelt die enorme Bedeutung dieser Komplexe in nahezu allen zellulären Prozessen wider. In den letzten Jahren hat sich gerade die Massenspektrometrie zu einer etablierten und nicht mehr wegzudenkenden Methode zur Untersuchung von Proteinen entwickelt. Während sie einst nur als Analyseverfahren zur Bestimmung von chemischen Substanzen diente, birgt die Massenspektrometrie vielseitige Anwendungsmöglichkeiten. Gerade bei der Charakterisierung von Protein-Interaktionen spielen stöchiometrische Zusammensetzungen sowie Affinitäten und Komplexstabilitäten eine wichtige Rolle – Proteineigenschaften, die massenspektrometrisch anhand ihres Masse-zu-Ladungs-(m/z)-Verhältnisses und der zu detektierenden Signalintensitäten in der Gas-Phase untersucht werden können. Eine radioaktive oder fluoreszenzspezifische Markierung, welche die Komplexe in ihren Eigenschaften beeinträchtigen könnte, ist bei dieser Technik nicht erforderlich. Weitere Vorteile sind die simultane Detektion aller in der Lösung enthaltenen Bestandteile sowie die schnelle und automatisierbare Handhabung.

Der Aufbau eines Massenspektrometers gliedert sich im Wesentlichen in drei Hauptbestandteile: Ionenquelle, Massenanalysator und Detektor [63]. In der Ionenquelle erfolgt zunächst die Ionisierung des Analyten. Hierfür stehen diverse Techniken zur Verfügung, wie zum Beispiel die Elektronenstoßionisierung (*Electron impact* – EI), die Elektrospray-Ionisierung (ESI), die chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck (*atmospheric pressure chemical ionization* – APCI) und die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisierung (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* – MALDI). Die Wahl der Ionenquelle hängt in erster Linie von der zu untersuchenden Probe ab. So kann z. B. die ESI-Technik nur dann verwendet werden, wenn die Ionen bereits in der Lösung vorliegen. Müssen sie in der Ionisationsquelle erst erzeugt werden, bedient man sich zum Beispiel der EI-, APCI- oder MALDI-Technik. Mit Hilfe eines schonenden Ionisationsverfahrens, wie es bei

der Elektrospray-Ionisierung angewandt wird, ist es möglich, auch wenig stabile Komplexe (z. B. nichtkovalente Komplexe) intakt in die Gas-Phase zu überführen. Der Massenanalysator übernimmt die Trennung der Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-( $m/z$ )-Verhältnis. Ähnlich wie bei den Ionisationsquellen ist auch die Bandbreite der Massenanalysatoren groß. So unterscheidet man zwischen Quadrupol-Geräten, Flugzeit-Analysatoren (*Time-of-flight* – TOF), Quadrupol-Ionenfallen und Fouriertransformationen-Ionenzyklotronresonanz (*Fourier transform ion cyclotron resonance* – FTICR). Unterschiede in den Geräten ergeben sich hinsichtlich des Auflösungsvermögens und des maximal zu detektierenden  $m/z$ -Bereichs. Zur Detektion werden meist Photomultiplier oder Mikrokanalplatten sowie Channeltrons eingesetzt.

### 1.2.1 Elektrospray-Ionisierung

Die Elektrospray-Ionisierung ist die meistverbreitete Ionisationsmethode zur Untersuchung von nichtkovalenten Komplexen. Eine schematische Darstellung einer Elektrosprayquelle ist in Abb. 7 zu finden, mit deren Hilfe das Prinzip der ESI-Technik kurz erläutert wird.

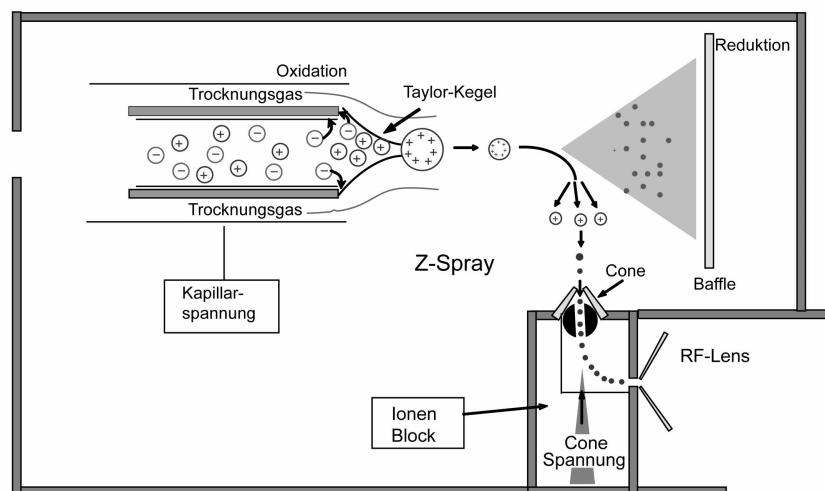


Abb. 7: Aufbau einer Elektrosprayquelle mit Z-förmigem Ioneneinlass.

Über eine Spritzenpumpe wird die zu untersuchende Lösung durch eine metallische Kapillare gepumpt, an deren Ende eine angelegte Spannung (Kapillarspannung) die Ausbildung eines elektrischen Feldes zwischen Kapillare und Gegenelektrode bewirkt. Aufgrund dieser Potentialdifferenz werden in Abhängigkeit von der angelegten Spannung nur positive oder negative Ionen von der Gegenelektrode angezogen. Auf der Flüssigkeitsoberfläche der Tropfen wird dadurch eine Ladungstrennung erzeugt, was die Ausbildung des sogenannten Taylor-Kegels (Taylor-Cone) induziert. Ist die angelegte Spannung groß genug, so bildet sich ein feiner Flüssigkeitsstrom, welcher in kleine, geladene Tröpfchen zerfällt. Die Vernebelung und Trocknung

der Lösung wird durch einen beheizbaren Stickstoffstrom (Trocknungsgas) koaxial zur Kapillare unterstützt. Durch diesen Trocknungsprozess wird die Tröpfchengröße reduziert – die Anzahl der Ladungsträger im Tröpfchen bleibt jedoch konstant. Dies zieht eine Verringerung des Oberflächen-Ladungs-Verhältnisses mit sich. Eine erhöhte Abstoßung zwischen gleichen Ladungsträgern im gleichen Tröpfchen ist die Folge. Ist diese Abstoßung auf der Oberfläche größer als die Oberflächenspannung der Lösung, ist das Rayleigh-Limit erreicht und es kommt zur Coulomb-Explosion, zum Zerfall der Initialtröpfchen. Danach bilden sich die freien Ionen in der Gas-Phase. Ein weiterer möglicher Mechanismus der Ionisation beschreibt die Ionenfreisetzung aus größeren, geladenen Tröpfchen, ohne die Kaskade der Coulomb-Explosionen zu durchlaufen. Beide Mechanismen sind gängige Modellvorstellungen bei der Erklärung der Elektrospray-Technik. Bis *dato* konnte nicht geklärt werden, welcher der beiden Mechanismen wirklich an der Ionisation beteiligt ist.

Die in dieser Arbeit verwendete Ionisationsquelle transferiert die Ionen in einem Z-förmigen Verlauf in die Gas-Phase (Abb. 7). Ein wesentlicher Vorteil dieser Anordnung ist ein verringerter Transfer von Kontaminationen und neutralen Teilchen. Diese werden nicht durch die Kapillarspannung über die Cone in das Massenspektrometer transferiert, sondern fliegen geradeaus und werden an der *Baffle* abgefangen.

### 1.2.2 Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer (Q-TOF)

Ein möglicher Massenanalysator, mit welchem die Elektrosprayquelle gekoppelt werden kann, ist ein Quadrupol-Flugzeitanalysator (Q-TOF). Im Wesentlichen ist ein Q-TOF-Instrument mit einem Triple-Quadrupol vergleichbar, bei welchem der letzte von drei Quadrupolen zur Massenanalyse durch einen Flugzeit- (*Time-of-flight* – TOF) Massenanalysator ersetzt wird. Das in dieser Arbeit verwendete Gerät besitzt neben den verbleibenden Quadrupolen Q1 und Q2 einen zusätzlich eingefügten Quadrupol (Q0) (Abb. 8). Dieser arbeitet im Radiofrequenzbereich und dient der Ionenfokussierung. Die an diesem Ionentunnel anliegende, radiofrequente Spannung wird als RF-Lens bezeichnet. Statt Quadrupolen können auch Hexapole eingesetzt werden. Dies ist im verwendeten Gerät für die Q0- und Q2-Einheit der Fall.

In einfachen MS- bzw. TOF-MS-Messungen fungieren die Quadrupole lediglich als Transmissionselemente, während das Flugrohr des TOF-Analysators als Massenanalysator verwendet wird. Da die Ionisation unter atmosphärischem Druck erfolgt, die Massenanalyse jedoch im Hochvakuum, wird der Druck über verschiedene Druckkammern graduell erniedrigt, um die Ionen schonend in die Vakuum-Region zu überführen. Die verschiedenen Druckkammern sind dabei über kleine Düsen miteinander verbunden. Haben die Ionen die Quadrupole bzw. Hexapole passiert, so werden sie durch einen kurzen Spannungsstoß beschleunigt, bevor die Ionen das

Flugrohr des TOF-Analysators erreichen. Ihre Geschwindigkeit ist dann von der Ladung und der Masse der Ionen abhängig, weshalb die Ionen zu unterschiedlichen Zeiten den Detektor erreichen. Die zu detektierende Flugzeit ist somit vom Masse-zu-Ladungs-Verhältnis der Ionen abhängig.

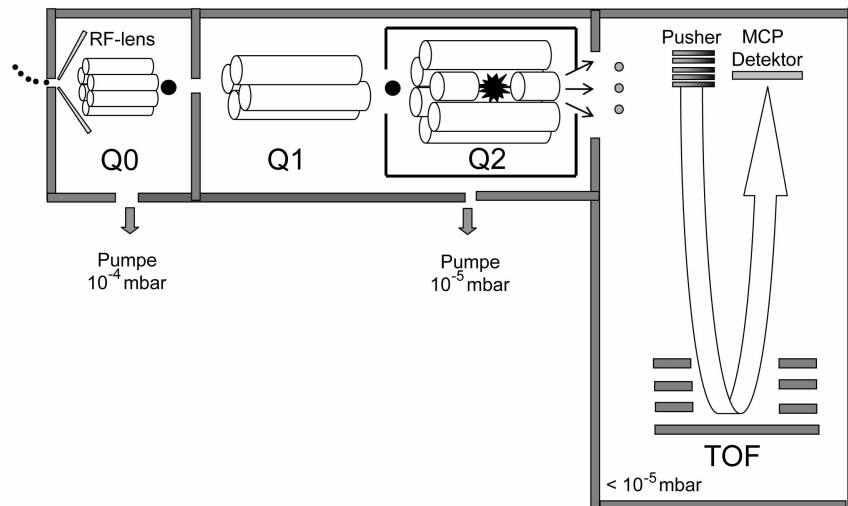
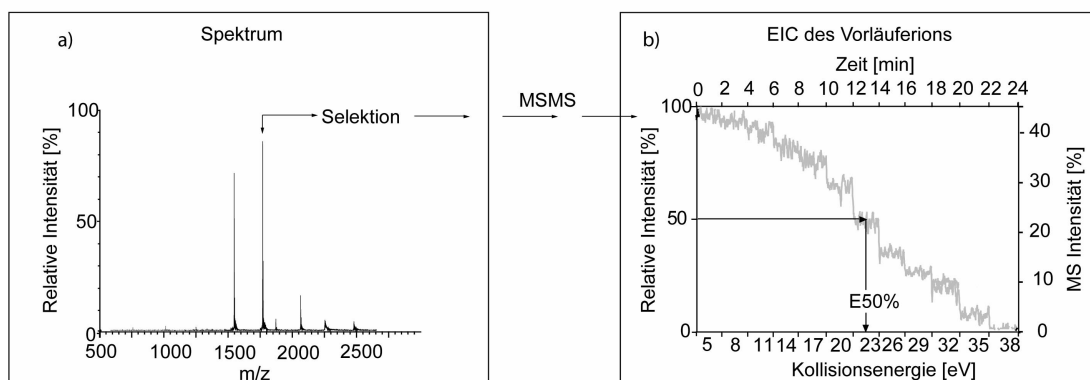


Abb. 8: Aufbau eines Quadrupol-Flugzeit-Massenanalysators.

Das Q-TOF Gerät eignet sich weiterhin als Tandem-Massenspektrometer, um die Fragmentierung einer einzelnen, bestimmten Proben-Komponente zu untersuchen. Hierfür wird die Q1-Einheit als Massenfilter eingesetzt. Dies erfolgt über eine bestimmte Einstellung des Quadrupols, welcher aus vier parallel angeordneten Metallstäben besteht. An die diagonalen Stäbe kann je eine Gleich- und eine Wechselspannung angelegt werden. Daraus resultiert ein Wechselfeld, wobei diagonal gegenüberliegende Stäbe gleiche Polarität der Gleichspannung und Phase der Wechselspannung besitzen. Entsprechend des Verhältnisses zwischen Gleich- und Wechselspannung können nur Ionen eines bestimmten  $m/z$ -Verhältnisses den Quadrupol passieren. Ionen mit einem anderen  $m/z$ -Verhältnis treffen dagegen auf die Stäbe und werden entladen. Auf diese Weise können Ionen, welche durch den Quadrupol fliegen, hinsichtlich ihres  $m/z$ -Verhältnisses selektiert werden. Die selektierten Ionen werden als Vorläuferionen bezeichnet. Diese Ionen werden, nachdem sie die Q1-Einheit passiert haben, über die Kollisionsenergie in Richtung Kollisionszelle (Q2) beschleunigt. Diese Zelle ist mit neutralen Gasmolekülen (meist Argon), dem Kollisionsgas, gefüllt. Kollisionen zwischen den Vorläuferionen und den Argonmolekülen leiten die Fragmentierung der Ionen ein. Je stärker ein Vorläuferion beschleunigt werden muss, ehe es zur Fragmentierung kommt, desto stabiler ist dieses. Die Geschwindigkeit, bzw. die Beschleunigung der Ionen wird über die Einstellung der Kollisionsenergie reguliert. Durch eine sukzessive Erhöhung dieser Energie wird die Fragmentierung eingeleitet.

Ein charakteristischer Wert für die Gas-Phasen-Stabilität der Vorläuferionen ist der E50%-Wert, der mit Hilfe des Chromatogramms des Vorläuferions (*Extracted Ion Chromatogram* – EIC) ermittelt werden kann (Abb. 9). Das EIC gibt den Signalverlauf für ein bestimmtes  $m/z$ -Verhältnis während der gesamten Messzeit wieder. Aufgrund der sukzessiven Erhöhung der Kollisionsenergie um 3 eV nach jeweils 2 Minuten nimmt das Signal des Vorläuferions mit der Zeit ab, was mit der Fragmentierung des Komplexes einhergeht. Die Kollisionsenergie, bei welcher die Hälfte des Komplexes dissoziiert ist, entspricht dem E50%-Wert. Bei einem Vergleich von verschiedenen Komplexen kann dieser Wert für eine erste Näherung von Stabilitätsaussagen herangezogen werden. Dabei ist der Komplex mit dem größeren E50%-Wert der stabilere, da mehr Energie zur Dissoziation aufgewandt werden musste.



**Abb. 9: Schematische Darstellung für den Verlauf einer kollisions-induzierten Dissoziation (CID).** a) MS-Spektrum, aus welchem ein bestimmtes  $m/z$ -Signal als Vorläuferion bestimmt werden kann. Dieses wird anschließend von den anderen Ionen im Q0 separiert und in der Kollisionszelle (Q2) fragmentiert. b) Chromatogramm des Vorläuferions (EIC) während der CID-Messung. Indem die Maximalintensität des Vorläuferions auf 100% normiert wird und die Zeit-Achse durch die Kollisionsenergie ersetzt wird, entspricht das EIC dem CID-Profil. Aus diesem kann der E50%-Wert ermittelt werden. Dieser gibt an, bei welcher Kollisionsenergie 50% des Vorläuferions dissoziiert vorliegen.

### 1.3 Weitere Untersuchungsmethoden für Protein-Protein-Interaktionen

Die Massenspektrometrie konnte sich erst in den letzten Jahren als Untersuchungsmethode für Protein-Protein-Interaktionen etablieren, was anhand der zahlreichen anderen Untersuchungsmethoden deutlich wird. So ist das *Yeast-Two-Hybrid*-System zum Beispiel eines der meist genutzten Systeme zur Charakterisierung von Protein-Interaktionen. Das System basiert auf einem genregulierenden Protein, einem sogenannten Transkriptionsfaktor. Dieser besteht aus zwei Domänen unterschiedlicher Funktion. An die Bindedomäne kann sich ein DNA-Molekül anlagern, wodurch die Aktivierungsdomäne die Transkription aktiviert. Sind die Domänen auf unterschiedlichen Polypeptidketten lokalisiert, so können sie durch nichtkovalente Protein-Protein-Interaktionen zusammengebracht und aktiviert werden. Ein wesentlicher Vorteil dieser *in vivo* Untersuchung ist die einfache Handhabung der Technik. Nachteilig ist, dass sich nicht alle Proteine in den Zellkern transferieren lassen, in welchem die Transkription abläuft. Außerdem können Strukturveränderungen zu falschen Ergebnissen führen.



---

Ein ähnliches *in vivo* System zur Untersuchung der Membranproteine stellt das ToxR-System dar. Das ToxR-Protein ist ein Membranprotein in der inneren Bakterienmembran und reguliert die Genexpression in *Vibrio cholerae*. Durch eine Dimerisierung des Proteins wird ein Promotor aktiviert, welcher die Transkription des *ctx*-Gens einleitet [64]. Dies ermöglicht die Untersuchung von Protein-Protein-Komplexen. Nachteilig an dieser Untersuchungsmethode ist allerdings, dass sich keine stöchiometrischen Verhältnisse der Komplexe ermitteln lassen. Die Stöchiometrie von Komplexen kann zum Beispiel mittels der Analytischen Ultrazentrifugation analysiert werden. Durch die Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit der Analyten können außerdem die Masse, Form und Gleichgewichtskonstanten der Komplexe genauer untersucht werden. Die Größenausschluss-Chromatographie (*size exclusion chromatography* – SEC), mit deren Hilfe Moleküle unterschiedlicher Größe voneinander getrennt werden können, bietet eine weitere Möglichkeit zum Nachweis von Protein-Komplexen. Der Einsatz einer speziellen Säule, welche mit einem inerten, dreidimensional vernetzten Trägermaterial gepackt ist, ermöglicht die Separation nach der Molekülgröße. Diagnostische Vergleichspeptide bekannten Molekulargewichts helfen anhand der Massenbestimmung, komplexierte von unkomplexierten Molekülen zu unterscheiden. Des Weiteren können auch Techniken wie milde Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE), Oberflächen-Plasmon-Resonanz oder Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zur Charakterisierung herangezogen werden.

## 2 Ziel der Arbeit

Nichtkovalente Protein-Komplexe sind an vielen biologischen Prozessen beteiligt, weshalb eine detaillierte Charakterisierung dieser Komplexe von großer Bedeutung ist. Da spezifische, nichtkovalente Komplexe nur über schwache Wechselwirkungen stabilisiert werden, gestaltet sich der Komplexnachweis oft sehr schwierig. Die Massenspektrometrie in Kombination mit schonenden Ionisationsmethoden ermöglicht häufig die Detektion von intakten, nichtkovalenten Protein- und Peptid-Komplexen in der Gas-Phase. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Oligomerisierung und Komplexbildung verschiedener Protein- und Peptidsysteme massenspektrometrisch zu analysieren und zu charakterisieren.

Zunächst galt es herauszufinden, wie sich spezielle Sequenzmotive auf die Oligomerisierung auswirken und ob einzelne Aminosäuren die stabilisierenden Wechselwirkungen so beeinflussen können, dass sich verschiedene Oligomerisierungstendenzen aufzeigen lassen. Weiterhin sollte die Komplexbildung unter variablen Bedingungen hinsichtlich der Probenzusammensetzung untersucht werden. Mit diesen Experimenten sollte geklärt werden, ob die Komplexeigenschaften der Flüssig-Phase mit denen in der Gas-Phase korrelieren. Dabei sollte untersucht werden, wie sich die Dielektrizitätskonstante der Lösung bzw. die Sekundärstruktur der Peptide auf die Oligomerisierung auswirkt.

Die Charakterisierung der Protein-Bindungseigenschaften von Protein-Ligand-Komplexen erfolgte mit Hilfe eines kontinuierlichen Flusssystems. Diese Messungen sollten Aussagen über die Bindungskapazitäten der Proteine zulassen. Darauf aufbauend galt es über die detektierbaren Protein-Ligand-Komplexe die Affinitäten und Spezifitäten verschiedener Liganden zu untersuchen. Dazu zählte auch die Bestimmung von Dissoziationskonstanten. Neben nativ gefalteten Komplexen sollten ferner teilentfaltete Komplexe, sogenannte *Molten Globules*, detektiert und charakterisiert werden. Die Untersuchung von Ligand-Bindungspositionen galt es durch Mutationen in der Aminosäuresequenz näher zu bestimmen.

Darüber hinaus ermöglichten kollisions-induzierte Messungen eine Einordnung von Gas-Phasen-Stabilitäten der verschiedenen Komplexe. Die erhaltenen E50%-Werte sollten in einer nachfolgenden Energienormierung in Dissoziationsenergien umgewandelt werden, welche sich mit Dissoziationskonstanten und mit bekannten Bindungsenthalpien vergleichen ließen. Anschließend war zu überprüfen, ob die bestimmten Gas-Phasen-Dissoziationsenergien mit Flüssig-Phasen-Bindungsenergien korrelieren und ob CID-Messungen für eine Bestimmung der Komplexstabilitäten herangezogen werden können.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Allgemeine Chemikalien

Standardchemikalien sowie Lösemittel wurden, sofern nicht anders erwähnt, von Sigma Aldrich (Steinheim, D), Merck (Darmstadt, D) und Appllichem (Darmstadt, D) bezogen.

#### 3.2 Molekulare Systeme

Die verwendeten VSV-Peptide, basierend auf der Aminosäuresequenz des *vesicular stomatitis virus* (VSV) Transmembransegments, wurden mittels Festphasensynthese nach der Boc-Strategie von Peptide Specialty Laboratories GmbH (Heidelberg, D) synthetisiert. Gleiches gilt für die Kontrollpeptide A16 und Glykophorin A.

Die verschiedenen Peptidnukleinsäuren wurden im Zuge eines Kooperationsprojektes mit der Universität Göttingen am Institut Organische und Biomolekulare Chemie (Prof. Diederichsen) mittels Boc-Festphasensynthese manuell synthetisiert.

Im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Freiburg (PD Dr. Schneider) wurden die Cytochrom  $b'_{559}$  P<sub>sbF</sub>-Peptide erhalten, welche in *E. coli* TB1 Zellen exprimiert und anschließend isoliert wurden. Hämatin wurde von der Firma Sigma Aldrich (Steinheim, D) bezogen.

Die Hämproteine Myoglobin (*horse heart*) und Hämoglobin (*human*) sowie Lysozym (*hen egg white*) stammten von der Firma Sigma Aldrich. Des Weiteren stand Cytochrom C (*Horse heart*) der Firma ICN Biomedicals Inc. (Aurora, USA) zur Verfügung. Als Liganden fungierten  $\beta$ -1,4-verknüpfte Chitosan Oligosaccharide (2-Amino-2-deoxy-D-glucopyranose, GlcN<sub>n</sub>, n= 1-6) und  $\beta$ -1,4-verknüpfte Chitin Oligosaccharide (N-Acetyl-D-glucosamin, GlcNAc<sub>n</sub>, n= 1-6) der Firma Seikagaku Kogyo Co. (Tokyo, Japan). Als interner Standard diente Malantide der Firma Merck (Darmstadt, D).

#### 3.3 Lipide

Zur Herstellung von Liposomen wurden die folgenden, synthetischen Lipide der Firma Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) verwendet: Palmitoyloleoyl-phosphatidylcholin (POPC), Dioleoyl-phosphatidylethanolamin (DOPE) und Dioleoyl-phosphatidylserin (DOPS).

### 3.4 Methoden

#### 3.4.1 Probenherstellung

Zu Beginn wurde von allen verwendeten Proteinen und Peptiden eine 70-150  $\mu\text{M}$  Stammlösung hergestellt. Um die Löslichkeit der Substanzen zu verbessern, wurden die Stammlösungen einer 30-minütigen Behandlung im Ultraschallbad unterzogen. Im Anschluss daran wurden die Proben in Abhängigkeit der verwendeten Lösemittel entweder mit einem FH-Sterilfilter (bei organischen Lösemitteln) oder HV-Sterilfilter (bei wässrigen Lösemitteln) der Porengröße 0,45  $\mu\text{m}$  (Firma Millipore, Eschborn, D) filtriert. Ungelöste Bestandteile oder Staubpartikel wurden auf diese Weise entfernt. Die Stammlösungen konnten bis zu ihrer weiteren Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden. Die Aufbewahrung der Hämproteine erfolgte bei  $4^\circ\text{C}$ . Die Herstellung der Messproben erfolgte durch Verdünnen der Stammlösungen mit dem entsprechenden Lösemittel. Die Proben wurden eine Stunde bei Raumtemperatur equilibriert und über Nacht bei  $-20^\circ\text{C}$  bzw. im Falle der Hämproteine bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Sowohl die quantitative Untersuchung der Peptide mittels UV als auch die Bestimmung der Sekundärstruktur und die massenspektrometrischen Charakterisierungen wurden an den nachfolgenden Tagen durchgeführt.

##### 3.4.1.1 VSV-Peptide

Für die konzentrationsabhängigen Messungen wurde eine 150  $\mu\text{M}$  Stammlösung mit einer 20 mM Ammoniumacetatlösung pH 7,4 und 100% TFE (v/v) verdünnt. Der Konzentrationsbereich erstreckte sich von 5-25  $\mu\text{M}$  in 80% TFE (v/v).

Die im Zuge der TFE-Titration verwendeten Proben enthielten 25  $\mu\text{M}$  Peptid, welche wiederum aus der Stammlösung mit einer 20 mM Ammoniumacetatlösung und 100% TFE (v/v) verdünnt wurden. Der TFE-Gehalt der verschiedenen Proben betrug am Ende 15 / 25 / 40 / 60 und 80% (v/v).

Für die Charakterisierung der Peptid-Oligomerisierung in Liposomen wurden kleine, unilamellare Vesikel (*small unilamellar vesicles* – SUV) aus multilamellaren Liposomen hergestellt. Diese beinhalteten ein 3:1:1 (v/v/v) Lipidgemisch aus Phosphatidylcholin (POPC), Phosphatidylserin (DOPS) und Phosphatidylethanolamin (DOPE). Erzeugt wurden diese aus den Stammlösungen der in Chloroform gelösten Lipide (10 mg/mL), wobei die End-Zusammensetzung 2,5 mg/mL Lipid und 1 mol% Peptid betragen sollte. Hierzu wurden 90  $\mu\text{L}$  POPC und je 30  $\mu\text{L}$  DOPS und DOPE mit 47  $\mu\text{L}$  des entsprechenden Peptids (Stammlösung 400  $\mu\text{M}$  in 100% TFE) zusammenpipettiert, wobei ein Peptid/Lipid (P/L)-Verhältnis von 0,01 erzeugt wurde. Nach dem Homogenisieren der Lösung durch Vortexen wurde mit Hilfe eines leichten Stickstoffstroms und Drehen des Gefäßes ein dünner Lipidfilm erzeugt. Die vollständige Entfernung des Lösemittels wurde durch Trocknung über Nacht im Vakuum bewerkstelligt. Am nächsten Tag erfolgte durch Zugabe von 600  $\mu\text{L}$  einer

10 mM Ammoniumacetatlösung die Rehydrierung der Probe. Durch einstündiges Schütteln der Lösung bei 1'400 rpm bildeten sich multilamellare Liposomen aus, welche anschließend im Eisbad gekühlt wurden. Kleine, unilamellare Vesikel wurden durch Extrusion hergestellt. Mit Hilfe eines Extruders wurde eine temperierte Lösung von multilamellaren Vesikeln 21-mal durch eine Polycarbonatmembran mit Porendurchmesser 100 nm gedrückt, wobei unilamellare Liposomen definierter Größe entstanden. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis, um ein Wachsen der Liposomen zu vermeiden. Höhere Oligomere sowie größere Liposomen wurden durch Zentrifugation (13'000 rpm / 4°C / 20 Minuten) entfernt.

Alternativ wurde eine andere Methode verwendet. Hierzu wurden 150 µL einer in Chloroform gelösten POPC-Lösung für 20 Minuten in der SpeedVac zur Herstellung eines dünnen Lipidfilms aufgetrocknet. Nach Rehydrieren des Lipidfilms in 800 µL Cyclohexan wurde 63 µL Peptid in 100% TFE zugegeben. Die Erzeugung unilamellarer Vesikel erfolgte durch Sonifizierung der Lösung bei einer Amplitude von 80% (Output 35-38%) für 8 Minuten unter Eiskühlung. Die entstehende, milchige Dispersion wurde bei -80°C für mindestens 15 Minuten gefroren und anschließend über Nacht lyophilisiert. Die gefriergetrockneten Proben konnten durch die Zugabe von 100% TFE zu Stammlösungen verarbeitet werden. Die verwendeten Messproben enthielten wiederum eine Peptidkonzentration von 25 µM in 80% TFE.

#### 3.4.1.2 Peptidnukleinsäuren

Die zu Beginn hergestellten 70 µM Stammlösungen der Peptidnukleinsäuren in 5 mM Ammoniumacetat pH 7,0 wurden für die nachfolgenden MS-Messungen auf eine Konzentration von 5 µM bzw. 10 µM verdünnt.

Hetero-Oligomerstudien wurden mit jeweils zwei verschiedenen PNA-Molekülen im Verhältnis 1:1 (je 10 µM Endkonzentration) durchgeführt. Durch Aufheizen auf 95°C, gefolgt von einer langsamen Abkühlphase über mehrere Stunden hinweg, wurden die Proben equilibriert.

#### 3.4.1.3 Cytochrom *b*'<sub>559</sub>-PsbF

Für die Erzeugung der Cytochrom *b*'<sub>559</sub> PsbF-Proben wurde analog der VSV-Probenherstellung verfahren. Die Peptid-Endkonzentration betrug dabei 12,5 µM. Für die Charakterisierung der sequenzabhängigen Peptid-Ligand-Interaktion wurden Messlösungen mit 12,5 µM Peptid und 2,8 µM Hämatin in 80% TFE (v/v) hergestellt.

#### 3.4.1.4 Lysozym-Ligand und Cytochrom C-Ligandsysteme

Alle Lysozymlösungen wurden in einer 10 mM Ammoniumacetatlösung pH 5,2 hergestellt. Ebenso die Cytochrom C-Lösungen, welche im Rahmen der Ligandstudien verwendet wurden. Die Endkonzentrationen der Proteine betragen in allen durchgeführten Messungen 5  $\mu$ M, während die Konzentration des zugegebenen Liganden automatisch über das Gradientensystem variiert wurde. Dabei wurde ein maximales Protein-Ligand-Verhältnis von 1:24 eingesetzt.

Für die kollisions-induzierten Messungen wurde folgende Probenzusammensetzung gewählt: 20  $\mu$ M Protein versetzt mit 1 mM Ligand.

#### 3.4.1.5 Hämproteine

Die Stammlösung der Hämproteine enthielt 150  $\mu$ M Protein und 10 mM Ammoniumacetat pH 7,4. Diese wurde zu 10, 20 und 50  $\mu$ M Proben verdünnt, welche später weiter charakterisiert wurden.

##### Denaturierungsstudien

Durch Zugabe von 0,25% (v/v) Ameisensäure zu einer 50  $\mu$ M Proteinlösung konnte die nichtkovalent gebundene Hämgruppe freigesetzt und apo-Myoglobin bzw. apo-Hämoglobin detektiert werden. Das gleiche Verfahren wurde bei Cytochrom C durchgeführt. Der pH-Wert dieser Lösung betrug 3,3.

Die Probenvorbereitung für die TFE-Titration erfolgte analog der TFE-Studie der VSV-Peptide. Die Endkonzentration der Proteinlösung betrug jedoch 50  $\mu$ M. Die verwendeten TFE-Konzentrationen waren 20, 40, 60 und 80% (v/v).

##### Reduktion des Oxidationszustandes des zentralen Eisenatoms

Durch die Zugabe von Dithiothreitol (DTT) wurde die Reduktion des Eisenatoms eingeleitet. Die Durchführung erfolgte durch Zugabe von 500  $\mu$ L einer 3 mM DTT-Lösung zu 500  $\mu$ L einer 150  $\mu$ M Proteinstammlösung und anschließender Inkubation von 30 Minuten. Ein Farbumschlag von rot nach braun zeigte die erfolgreiche Reduktion des Eisenatoms an. Die Probe wurde dann mit 500  $\mu$ L einer 10 mM Ammoniumacetatlösung pH 7,4 auf eine Protein-Endkonzentration von 50  $\mu$ M und eine DTT-Konzentration von 1 mM verdünnt. Eine Lagerung der reduzierten Proben war bei 4°C möglich.

### 3.4.2 Peptidquantifizierung

Die Quantifizierung der Proteine und Peptide erfolgte mittels UV/VIS-Spektroskopie unter Verwendung eines Photometers (Ultraspec 3100 pro) der Firma Amersham Bioscience (Buckinghamshire, UK). Die Absorptionswellenlänge wurde in Abhängigkeit des zu untersuchenden, molekularen Systems variiert. Wenn nicht anders erwähnt, wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm, bei welcher aromatische Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin) absorbieren, in einer 100  $\mu\text{L}$  Mikroquarzküvette (Firma Hellma Optik, Jena, D) gemessen. Zur Bestimmung des Basiswertes wurde diejenige Lösemittelzusammensetzung gewählt, in welcher die zu quantifizierende Probe gelöst wurde. Bei Kenntnis des Extinktionskoeffizienten (entnommen der homepage: [www.expasy.org](http://www.expasy.org)) kann mit Hilfe des Lambert Beer'schen Gesetzes die Konzentration der Probe berechnet werden.

Die Extinktionskoeffizienten der Peptidnucleinsäuren lassen sich unter der Annahme, dass sie sich wie die der Nucleosidmonophosphate verhalten, durch Addition der Extinktionskoeffizienten berechnen [65-67]. Die Einzelkoeffizienten sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Die Absorption wurde jeweils bei 254 nm bestimmt.

<b>Nucleosidmonophosphat</b>	<b><math>\epsilon_{254}</math> [<math>\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}</math>]</b>
Cytosin	6'541
Guanin	13'679
Thymin	7'250
Adenin	13'200

Der Extinktionskoeffizient von Häm in 100% TFE (v/v) wurde im Rahmen des Kooperationsprojektes im Labor von PD Dr. Dirk Schneider (Universität Freiburg) bei 395 nm zu  $117 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bestimmt.

### 3.4.3 Bestimmung der Sekundärstruktur mittels Zirkular Dichroismus

Mit Hilfe der Zirkular Dichroismus (*circular dichroism* – CD) Spektroskopie wurden die Sekundärstrukturanteile der verwendeten Komplexsysteme bestimmt. Diese Methode erlaubt durch Absorption im kurzwelligen UV-Bereich (180-260 nm) die Anregung der Amidregion, was Aussagen über den Faltungszustand des Systems zulässt [68]. Über die charakteristische Absorption der verschiedenen Strukturelemente bei unterschiedlichen Wellenlängen kann die Sekundärstruktur des Proteins bestimmt werden. Typische Minima und Maxima der verschiedenen Sekundärstrukturelemente sind der Abb. 10 zu entnehmen.

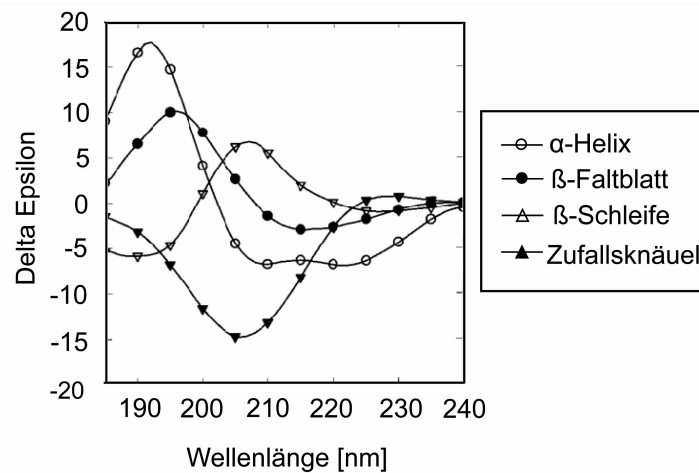


Abb. 10: Fern-UV-Einzelspektren der Sekundärstrukturanteile. Abbildung verändert nach [69, 70].

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Strukturbestimmungen kamen zwei Geräte der Firma Jasco (Easton, USA) zum Einsatz. Die Struktur der VSV-Peptide wurde mit dem Spectropolarimeter 150-S (J-810) bestimmt, während die der Hämproteine mit dem J-715 Modell vermessen wurde. Für alle Messungen wurde eine Quarzküvette mit Schichtdicke 1 mm verwendet. Eine Akkumulation von 10 Einzelspektren, welche im Scanbereich 190-260 nm mit einer Geschwindigkeit von 100 nm/min aufgezeichnet wurden, erlaubte eine gute Reproduzierbarkeit. Als Referenz diente das jeweilige Lösemittel, wobei die Spektren automatisch von der Software *Spectra Manager for Windows 95/NT* (Version 1.54.03 (Build1)) um den Leerwert korrigiert wurden. Nach der Umwandlung aller Spektren in molare Elliptizitäten konnte mit Hilfe der *CDNN Software* [71] und eines geeigneten Algorithmus die Sekundärstruktur ermittelt werden. Für die Strukturbestimmung der VSV-Peptide wurde der PEPFIT Algorithmus [72] verwendet.

#### 3.4.4 MS-Messungen

Für die massenspektrometrischen Analysen wurde, sofern nicht anders erwähnt, ein Quadrupol-Time-of-Flight (Q-TOF, Ultima 2) Gerät der Firma Waters Micromass (Manchester, UK) verwendet. Zu Beginn der jeweiligen Untersuchung wurde eine Kalibration hinsichtlich der Massenakkurazität und der Auflösung mit NaI / Csl als Referenzsubstanz durchgeführt. Anschließend wurden die Proteinproben nach einer Aufwärmphase bei Raumtemperatur mit Hilfe einer externen Spritzenpumpe (Firma Harvard Apparatus, Hugo Sachs Elektronik, Hugenstetten, Deutschland – Model 11 Plus) über eine micro-Elektrospray-Ionisationsquelle in das Massenspektrometer transferiert. Die Detektion erfolgte für alle verwendeten Protein- und Peptid-Komplexe im positiven Ionenmodus. Die Geräteparameter, welche die Ionisierung der Moleküle beeinflussen, wie Kapillarspannung, Cone- und RF-Lens Spannung, wurden für jedes Proteinsystem, wie im Kapitel 4.2 beschrieben, optimiert. Dadurch konnte ein maximaler Transfer und eine optimale Detektion



der einzelnen, nichtkovalenten Komplexe gewährleistet werden. Die optimierten Messparameter der jeweiligen Protein-Komplexe sind dem Anhang zu entnehmen. Einstellungen wie die Source-Temperatur und die Temperatur des Trocknungsgases betragen für alle durchgeführten Messungen 80°C bzw. 150°C. Auch die Gasflüsse für das Conegas (50 L/h) und für das Trocknungsgas (350 L/h) wurden nicht verändert.

In den erstellten Massenspektren lassen sich neben protonierten Signalen, welche gemäß der angegebenen Ladung eine entsprechende Anzahl an Protonen tragen, auch immer Natriumaddukte detektieren. Da den Lösungen kein Natriumsalz zugesetzt wurde, resultieren die zu beobachtenden Addukte aus Verunreinigungen der verwendeten Lösemittel und aus den Glasgeräten. Die Natriumaddukte werden in den dargestellten Spektren mit einer entsprechenden Anzahl an \*-Symbolen markiert.

#### 3.4.4.1 MS/MS-Messungen

Zur Bestimmung von Komplexstabilitäten wurde der MS/MS-Modus des Q-TOFs verwendet. Das zu untersuchende Vorläuferion wird im Q1 sowohl selektiert als auch separiert. Dabei ist darauf zu achten, dass der ausgewählte, zu transmittierende Bereich groß genug gewählt wird, um die gesamte Isotopenverteilung des Ions zu beinhalten, trotzdem aber klein genug ist, um eventuelle Verunreinigungen auszuschließen. Der ausgewählte Massebereich wurde daher auf 1 Da festgelegt. Die Dissoziation der Komplexe wurde durch eine stufenweise Erhöhung der Kollisionsenergie herbeigeführt. Je nach Stabilität der zu untersuchenden Komplexe betrug die Start-Kollisionsenergie 1 bzw. 5 eV. Diese wurde nach 2 Minuten um 2 bis 3 eV erhöht, bis das Vorläuferion vollständig fragmentiert wurde.

Zur Erstellung der Dissoziationskurven (CID-Profile) wurden die Spektren zweimal für je 1 Minute aufsummiert und durch Verwendung der *three-point Savitzky-Golay* Methode geglättet. Nach Zentrieren der Signale hinsichtlich der Peakfläche wurde aus den erhaltenen Intensitäten des Vorläuferions der Mittelwert gebildet. Eine Normierung der Werte erfolgte durch das Festlegen der maximalen Komplexintensität auf 100%. Die normierten Mittelwerte wurden gegen die Kollisionsenergie aufgetragen. Die Abnahme des Komplexes aufgrund der Dissoziation wird durch einen sigmoidalen Kurvenverlauf wiedergegeben. Aussagen über die Komplexstabilität können über den E50%-Wert gemacht werden. Dieser Wert wird durch die Kollisionsenergie definiert, bei welcher die Hälfte des Komplexes dissoziiert vorliegt.

Unterschiedliche Einstellungen der Sprayparameter nehmen keinen Einfluss auf den E50%-Wert der Komplexe, sondern lediglich auf deren Intensität. Dies wurde anhand des  $[\text{Lys}(\text{GlcNAc}_3)]^{8+}$ -Komplexes analysiert (siehe Anhang). Lediglich der in der Kollisionszelle vorherrschende

Argondruck hat maßgeblichen Einfluss auf die Dissoziation, weshalb dieser für die MS/MS-Messungen nicht verändert wurde. Der Druck konnte über das Einlassventil konstant gehalten werden, dennoch innerhalb der Kollisionszelle aufgrund eines fehlenden Manometers nicht exakt bestimmt werden. Deshalb wird ein Näherungswert von  $2 \cdot 10^{-3}$  mbar angenommen.

#### 3.4.4.2 Peptidmassen-Fingerabdruck – Peptide Mass Fingerprint

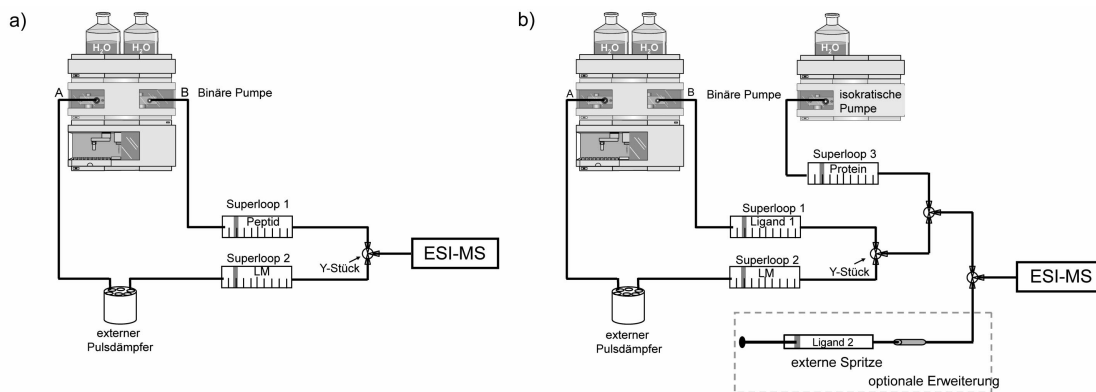
Die Extraktion der Tryptophan-Synthase Untereinheiten aus Maisblättern wurde im Rahmen einer Projektarbeit in der Forschungsgruppe von Dr. Erich Glawischnig (Lehrstuhl für Genetik, Technische Universität München) durchgeführt. Nach der Trennung der Proteine mittels Größenausschluss-Chromatographie wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) gestartet. Nach der Färbung des Gels wurden die Proteinbanden zwischen 25 und 60 kDa sowie die Bande bei 160 kDa aus dem Gel ausgeschnitten und der tryptische Verdau nach der Entfärbung der Gelstücke durchgeführt. Anschließend wurden die Peptide sowohl durch basische als auch durch saure Extraktion aus dem Gel herausgefiltriert. Die Aufnahme der Probe in einer MS-kompatiblen Lösung (20 mM Ammoniumacetat pH 7,4, 10% Acetonitril und 5 mM DTT) ermöglichte die Durchführung des *Peptide-Mass-Fingerprints*. Als Massenspektrometer diente ein LC/MSD TOF der Firma Agilent (Santa Clara, USA). Die daran gekoppelte HPLC-Anlage der Serie 1100 (Agilent, Waldbronn, D) wurde in ihrer herkömmlichen Funktion als Trennmethode verwendet. Die Anlage setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: quartäre Kapillarpumpe, Degaser, Autosampler und Säulenofen. Die chromatographische Trennung erfolgte mit einer Zorbax SB C18 Säule (Agilent, Santa Clara, USA) durch die Injektion von 8 µL Probe (150 x ID 0,5 mm; 5 µm). Die Säule wurde auf 40°C temperiert. Die Flussrate der HPLC-Anlage betrug 50 µL/min. Zu Beginn eines jeden chromatographischen Laufs wurde die Säule mit 95% einer 20 mM Ammoniumacetatlösung und 5% Acetonitril konditioniert. Danach wurde innerhalb von 5 Minuten durch das binäre Pumpensystem die Acetonitrilkonzentration auf 80% erhöht. Diese finale Lösemittelzusammensetzung wurde für 15 Minuten beibehalten.

Für die Messungen wurde ein m/z-Bereich von 150-3'200 vermessen. Als Einstellungen des Trocknungsgases wurden eine Temperatur von 350°C und ein Gasfluss von 420L/h gewählt. Der Zerstäubergasdruck betrug 20 psig. Des Weiteren wurde eine Kapillarspannung von 4'000 V, eine Skimmerspannung von 60 V und eine Fragmentorspannung von 215 V verwendet.

#### 3.4.4.3 Kontinuierliche Flusssysteme (Continuous Flow)

Durch die Kopplung von HPLC-Anlagen an massenspektrometrische Geräte können zeitoptimierte Gradientenmessungen zum Beispiel in Bezug auf eine variable Konzentration innerhalb einer Messung durchgeführt werden. Durch die automatisierte Erhöhung einer Komponentenkonzentration kann bei der Probenherstellung Zeit gespart werden, da nur eine Probe in der höchsten Konzentration bereitgestellt werden muss. Diese wird automatisch über die Pumpen der HPLC-Anlage mit dem Lösemittel verdünnt. Ein weiterer Vorteil besteht zudem in der kontinuierlichen Messung über den gesamten Konzentrationsbereich. Ein Abstellen der im Massenspektrometer angelegten Spannungen nach den einzelnen Messungen verschiedener Proteinkonzentrationen ist nicht mehr erforderlich, wodurch Sprünge in den Intensitäten verhindert werden können. Für diese Messungen wird die HPLC-Anlage nicht in ihrer herkömmlichen Funktion als Trennmethode verwendet. Lediglich die Pumpen werden in den Aufbau der Gradientenmessungen einbezogen.

Abb. 11 a gibt den Versuchsaufbau einer Gradientenmessung wieder, über welche die Konzentration eines Interaktionspartners mit Hilfe der binären Pumpe einer HPLC-Anlage gesteuert wird. Als Laufmittel wird Wasser, versetzt mit 5% Methanol (um einer Veralgung der Pumpen vorzubeugen), verwendet. Über die Pumpen und das Laufmittel wird die Gradientenmessung reguliert. Das Laufmittel kommt dabei nicht in Kontakt mit der Probe, sondern dient lediglich als Transportmittel. Die zu untersuchende Probe befindet sich in einem Zwei-Kammern-Vorratsgefäß (Superloop), dessen Kammern durch einen beweglichen Kolben voneinander getrennt werden. Eine Kammer wird möglichst luftblasenfrei mit Peptidlösung gefüllt, die andere, welche direkt mit den Pumpen der HPLC verbunden ist, mit Wasser. Aufgrund des von der HPLC gepumpten Laufmittels erhöht sich der Druck im Superloop, was den Kolben in Bewegung versetzt und die Peptidlösung aus dem Superloop drückt. Durch den Einsatz zweier Superloops – eines befüllt mit Peptidlösung, das andere mit Lösemittel – kann über den eingestellten Pumpgradienten ein Konzentrationsgradient erzeugt werden. Lösemittel und Peptidlösung mischen sich beim Durchlaufen des Y-Stücks. Dieses ist mit einer Fritte ausgestattet, welche durch Verwirbelungen eine gute Durchmischung der beiden Lösungen erzeugt. Anschließend wird die verdünnte Peptid-Mischung ins Massenspektrometer gepumpt.



**Abb. 11: Gradientensystem zur automatisierten Durchführung von Konzentrationsmessungen.** a) Einfaches System, welches konzentrationsabhängige Messungen eines Peptids erlaubt. b) Erweitertes Gradientensystem, mit welchem Protein-Ligand-Komplexe ebenfalls konzentrationsabhängig untersucht werden können. Optional kann durch die Verwendung einer externen Spritzenpumpe ein Protein in Abhängigkeit zweier Liganden untersucht werden, wobei für einen der Liganden ein Konzentrationsgradient über die binäre HPLC-Pumpe durchgeführt werden kann.

Das beschriebene Gradientensystem kann beliebig variiert und erweitert werden. Mit Hilfe einer zusätzlichen Pumpe können zum Beispiel Protein-Ligand-Komplexe in Abhängigkeit der Protein- oder der Ligandkonzentration untersucht werden. Durch den in Abb. 11 b dargestellten Versuchsaufbau kann zu einer Proteinlösung (Superloop 3) konzentrationsabhängig über die binäre Pumpe des Systems der Ligand (Superloop 1) zudosiert werden. Optional kann das System durch eine externe Spritze erweitert werden und die Charakterisierung des Proteins in Anwesenheit zweier Liganden vorgenommen werden. Dieser Systemaufbau kam bei der Verdrängungsreaktion von  $\text{GlcNAc}_3$  aus der hydrophoben Tasche von Lysozym mit  $\text{GlcNAc}_6$  zum Einsatz (siehe Kapitel 4.4.1.4). Da das Substrat  $\text{GlcNAc}_6$  über die externe Spritzenpumpe dem System zugeführt wurde, konnte es erst nach dem letzten Y-Stück mit Lysozym reagieren. Durch die Verwendung eines geeigneten Tubings (830 mm x ID 0,25 mm; 1/16") konnte die stattfindende Hydrolysereaktion gering gehalten werden (hier 70 Sekunden).

Die verwendete HPLC-Anlage (System Gold der Firma Beckman Coulter, Fullerton, USA) wurde mit den Pumpsystemen System Gold 126 Solvent Modul betrieben. Als Detektor stand der System Gold 168 Detector zur Verfügung.

Für die Datenerfassung und die Auswertung wurden folgende Software Programme verwendet: MassLynx 4.0 der Firma Micromass (Manchester, UK) und Analyst QS Software (LC-MS TOF Software, Ver. A.01.00 (B663), Edition: Juni, 2004) der Firma Agilent Technologies (Waldbronn, D).

#### 3.4.4.4 Affinitätsstudien mittels Scatchard-Plot

Die Messungen zur Bestimmung der Affinitätskonstanten wurden mit Hilfe des in Kapitel 3.4.4.3 beschriebenen Gradientensystems (siehe Abb. 11 b) durchgeführt. Als Protein wurde in Superloop 3 eine 5  $\mu\text{M}$  Lysozymlösung eingesetzt. Dieser Lösung konnten über die binäre HPLC-Pumpe kontinuierlich unterschiedliche Ligandkonzentrationen (max. 117  $\mu\text{M}$ ) zugesetzt werden. Da für Lysozym nur eine Ligandbindungsstelle bekannt ist [59], kann die Bestimmung der Dissoziationskonstanten mit Hilfe des Scatchard-Plots erfolgen [73, 74]. Sind mehrere Bindungsstellen bekannt, so kann diese Art der Auswertung nur herangezogen werden, wenn die Bindungsstellen als gleichwertig und unabhängig voneinander betrachtet werden können.

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten erfolgte mit Hilfe der massenspektrometrisch erhaltenen Intensitäten der 8-fach geladenen Protein- und Komplexsignale. Benötigt wurden hierfür die Intensitäten des freien, in der Lösung vorliegenden Proteins sowie die Intensitäten der aus der Zusammenlagerung von Protein und Ligand resultierenden Komplexe. Auch die Signalintensität des ungebundenen Liganden wurde zur Berechnung herangezogen. Unter der Annahme, dass freies Lysozym und die Komplexe einen ähnlichen Ionisationsfaktor aufweisen, können ihre Signalintensitäten aufsummiert und dadurch die Gesamtsignalintensität von Lysozym bestimmt werden. Diese Gesamtsignalintensität entspricht der bekannten Proteinkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  ( $[\text{Prot}]_{\text{total}}$ ). Die Komplexkonzentration ( $[\text{Komplex}]$ ) kann dann anteilmäßig aus der Proteinkonzentration und den Komplexintensitäten bestimmt werden. Die Konzentration des freien, in der Lösung enthaltenen Liganden ( $[\text{L}]_{\text{frei}}$ ) kann anschließend durch Subtraktion der Konzentration an gebundenen Liganden von der bekannten Gesamtligandkonzentration berechnet werden. Dabei kann die Konzentration der gebundenen Liganden mit der bereits ermittelten Konzentration an Komplex gleichgesetzt werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Klassische Charakterisierung nichtkovalenter Komplexe

Der Nachweis nichtkovalenter Protein- und Peptid-Komplexe kann auf verschiedene Arten erfolgen. Wie eingangs erwähnt, stellen neben massenspektrometrischen Untersuchungsmethoden auch die Analytische Ultrazentrifugation [75], die Oberflächen-Plasmon-Resonanz [76] sowie das *Yeast-Two-Hybrid*-System wichtige Techniken zur Untersuchung nichtkovalenter Komplexe dar.

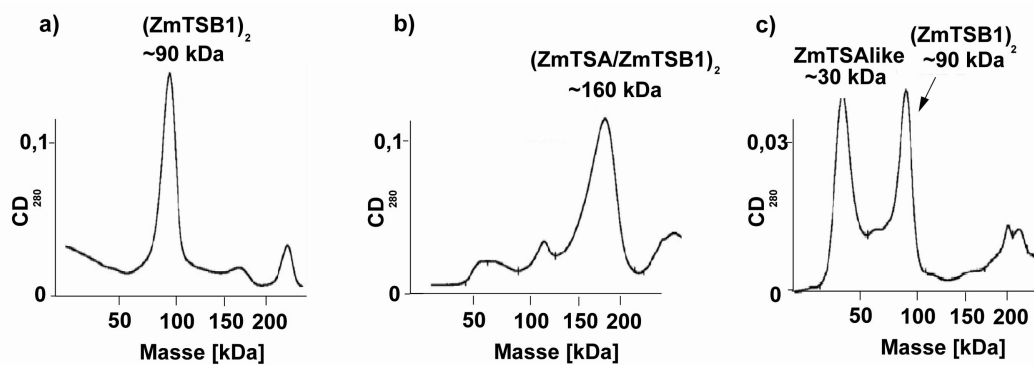
Zusammen mit der Forschungsgruppe von Dr. Erich Glawischnig (Lehrstuhl für Genetik, Technische Universität München) wurde im Rahmen einer Projektarbeit der nichtkovalente Zusammenschluss eines Multienzym-Komplexes mit einer nicht-massenspektrometrischen Technik nachgewiesen. Hierzu diente die Größenausschluss-Chromatographie. Vervollständigt wurde der Nachweis durch die Bestimmung der Untereinheiten mit der Methodik des Peptidmassen-Fingerabdrucks.

#### 4.1.1 Nachweis des Tryptophan-Synthase-Komplexes in Mais

Die Tryptophan-Synthase wird von einem bifunktionellen Enzym, der Tryptophan-Synthase (TS), gesteuert. Dieses Enzym besteht aus zwei TS- $\alpha$ -Untereinheiten (TSA) und zwei TS- $\beta$ -Untereinheiten (TSB). Über nichtkovalente Wechselwirkungen lagern sich diese zu einem tetrameren Komplex zusammen, welcher in Bakterien wie z. B. *Salmonella typhimurium* bereits sehr gut untersucht wurde. Für Mais sind zwei nahezu identische TSB-Proteine (*ZmTSB1* und *ZmTSB2*) mit einer Sequenzhomologie von 91% bekannt. Des Weiteren können insgesamt vier TSA-Analoga (BX 1, IGL, *ZmTSAlike* und *ZmTSA*) das Substrat der Tryptophan-Synthase spalten [77-80]. Mit Hilfe der gelchromatographischen Methode sollte in Kombination mit LC-MS-Messungen herausgefunden werden, welches dieser Proteine direkt an der Tryptophan-Synthase beteiligt ist.

Die Ausbildung eines tetrameren Komplexes aus zwei TSA- und zwei TSB-Untereinheiten wurde *in vitro* durch heterolog exprimierte Proteine in der Arbeitsgruppe von Dr. Glawischnig mit Hilfe der Gelfiltration bestätigt (Abb. 12 a-c). Dem Hauptsignal im Absorptionsspektrum einer *ZmTSB1*-Lösung (Abb. 12 a) konnte eine Masse von ~90 kDa zugeordnet werden. Diese Masse entspricht einem *ZmTSB1*-Dimer. Eine Mischung aus *ZmTSA*- und *ZmTSB1* zeigte im Absorptionsspektrum ebenfalls ein Hauptsignal, jedoch mit einem Molekulargewicht von ~160 kDa (Abb. 12 b). Dieses Signal deutete auf die Komplexbildung zweier *ZmTSA*-Untereinheiten (je 30 kDa) und zweier *ZmTSB1*-Untereinheiten (je 45 kDa) hin. Im Gegensatz dazu wurden bei der *ZmTSAlike*- und

*Zm*TSB1-Mischung zwei Signale detektiert, welche sich der monomeren *Zm*TSAlike-Untereinheit (~30 kDa) und der dimeren *Zm*TSB1-Untereinheit (~90 kDa) zuordnen ließen (Abb. 12 c).

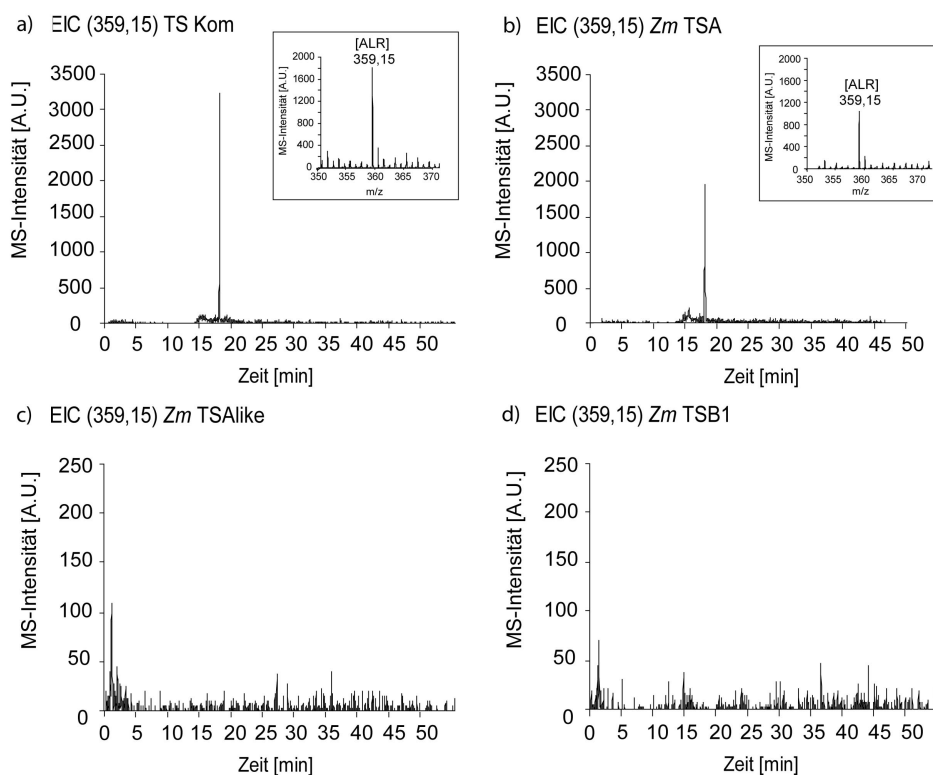


**Abb. 12: Komplexbildung der Untereinheiten der Tryptophan-Synthase aus heterolog exprimierten Proteinen, charakterisiert mittels Größenausschluss-Chromatographie.** a) Die TSB1-Untereinheit ist als Dimer mit einer Masse von ~90 kDa nachweisbar. b) In der Mischung aus *Zm*TSA und *Zm*TSB1 wird ein Hauptsignal bei ~160 kDa detektiert. Dieses gibt die Komplexbildung aus zwei monomeren TSA- und einer dimeren TSB1-Untereinheit wieder. c) Für *Zm*TSAlike kann in der Mischung mit *Zm*TSB1 aufgrund der Retention zweier Signale bei ~90 kDa und bei ~30 kDa keine Komplexbildung verzeichnet werden. (Abbildung bearbeitet nach [81], mit freundlicher Genehmigung von Verena Kriechbaumer)

Die tetramere Komplexbildung der verschiedenen, heterolog exprimierten Proteine konnte mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie eindeutig für die *Zm*TSA-Untereinheiten und die *Zm*TSB1-Untereinheiten nachgewiesen werden.

Die *in vivo* Identifizierung des Tryptophan-Synthase-Komplexes in Mais-Blattextrakten wurde anschließend mit Hilfe eines Peptidmassen-Fingerabdrucks durchgeführt. Die heterolog exprimierten Proteine dienten dabei als diagnostische Peptide, mit welchen die aus Maisblättern extrahierten Komplexe verglichen wurden. Die Extrakte der Maisblätter wurden ebenfalls der Größenausschluss-Chromatographie unterzogen und die in den Fraktionen enthaltenen Proteine in einer nachfolgenden SDS-PAGE-Analyse aufgetrennt. Durch die Anfärbung des Gels wurden die Proteine sichtbar gemacht [81]. Da kleinere Peptidstücke im Massenspektrometer sensitiver nachgewiesen werden können, wurde ein tryptischer Verdau der Proteine im Gel durchgeführt. Hierzu wurde der Protein-Komplex durch Ausschneiden der 160 kDa Bande aus dem SDS-Gel isoliert und im Anschluss mit Trypsin gespalten. Die aus dem Verdau resultierenden Sequenzfragmente wurden massenspektrometrisch analysiert. Ein Vergleich zwischen den aus Blattextrakten gewonnenen Massenspektren mit denen der heterolog exprimierten Proteine erlaubte die spezifische Zuordnung einiger Signale. In Abb. 13 a konnte ein Signal bei einer Retentionszeit von 18,1 Minuten beobachtet werden, welchem anhand des Massenspektrums ein m/z-Wert von 359,15 zugeordnet wurde. Das gleiche Signal ließ sich mit der gleichen Retentionszeit und einem identischen m/z-Wert auch in der heterolog exprimierten *Zm*TSA-Untereinheit nachweisen (Abb. 13 b). Eine identische Retentionszeit zusammen mit dem identischen m/z-Wert bestätigte die Existenz eines gleichen Peptidfragments in den verschiedenen Proben. Dem Signal wurde die Aminosäuresequenz ALR zugeordnet. In den heterolog

exprimierten *ZmTSA*-like- und in den *ZmTSA*-Untereinheiten konnte dieses Peptidfragment nicht nachgewiesen werden (Abb. 13 c und d).



**Abb. 13 a-d: Identifizierung der *ZmTSA*-Untereinheit im Tryptophan-Synthase-Komplex, extrahiert aus Maisblättern.** Exemplarisch wird hier ein Signal herausgegriffen, welches sich eindeutig der *ZmTSA*-Untereinheit zuordnen ließ. a) Spektrum des TS-Komplexes zeigt ein Signal bei 359,15 (= ALR). b – d) In den Spektren der diagnostischen Peptide lässt sich das Signal ausschließlich in der *ZmTSA*-Untereinheit (b) wiederfinden. Nicht jedoch in den Spektren der *ZmTSA*-like- (c) und *ZmTSA*- (d) Untereinheit.

Weitere Fragmente des TS-Komplexes aus Maisblättern, welche im Massenspektrum des diagnostischen *ZmTSA*-Peptids zugeordnet werden konnten, sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Keines dieser Fragmente wurde in den Massenspektren der anderen TSA-Homologen (*ZmTSA*-like, BX 1 und IGL) gefunden, weshalb die Zuordnung zum *ZmTSA*-Peptid eindeutig war.

**Tabelle 2: Übereinstimmende MS-Signale der aus Mais-Blattextrakten isolierten *ZmTSA*-Sequenz und der Sequenz des heterolog exprimierten *ZmTSA*-Proteins.**

Retentionszeit [min]	m/z	Ladung	berechnete Masse [Da]	Sequenz
15,1	371,239	1+	370,449	AALP
15,5	687,361	2+	1'373,480	TLEEAASPEEGLK
15,7	663,860	2+	1'326,528	GTTFEDVISMVK
18,2	359,151	1+	359,440	ALR



Weitere der im TS-Komplex gefundenen Fragmente konnten der TSB-Untereinheit zugeordnet werden. Das zweifach geladene Signal bei 423,2 entspricht der Aminosäureabfolge QALNVFR der *ZmTSB1*-Untereinheit. Die Signale bei 574,3 und 435,8 wiesen ebenfalls auf Fragmente der  $\beta$ -Untereinheit hin. Eine spezifische Zuordnung zu einem der beiden Homologen *ZmTSB1* und *ZmTSB2* konnte aufgrund der hohen Sequenzhomologie der beiden Untereinheiten jedoch nicht erfolgen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Komplexbildung zwischen der *ZmTSB1*- und der *ZmTSA*-Untereinheit mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie nachgewiesen werden konnte, während in einer Mischung mit *ZmTSB1* und *ZmTSA* keine Komplexbildung detektiert wurde. Die *ZmTSA*-Untereinheit fungiert somit eindeutig als Bestandteil des TS-Komplexes in Maisblättern. Durch die Massenspektrometrie wurden die Bestandteile des aus Maisblättern extrahierten, tetrameren TS-Komplexes identifiziert. Auch mit dieser Methode ging die *ZmTSA*-Untereinheit eindeutig als Komplexbestandteil hervor.

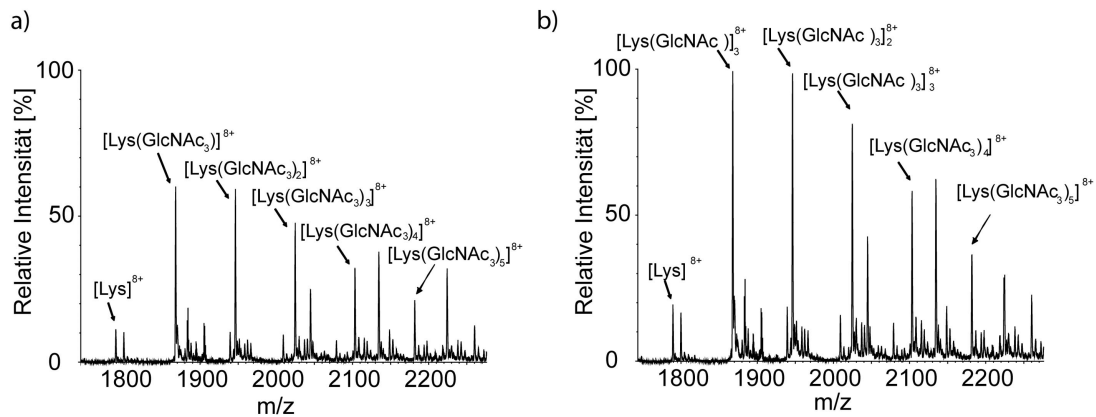
## 4.2 Methodenoptimierung zur Charakterisierung nichtkovalenter Komplexe

Im vorangegangenen Kapitel wurde der Nachweis eines nichtkovalenten Komplexes mit einer nicht-massenspektrometrischen Technik beschrieben. Exakt identifiziert werden konnten die Komplexbestandteile allerdings erst durch die nachfolgende, massenspektrometrische Untersuchung des isolierten Komplexes. Die Massenspektrometrie liefert somit wichtige Ergebnisse in Bezug auf die Identifizierung und die genaue Charakterisierung nichtkovalenter Komplexe. Im Folgenden wird daher die Charakterisierung der Peptid-Peptid- sowie Protein-Ligand-Komplexe direkt mit Hilfe der Massenspektrometrie vorgenommen. Für diese Studien wurden verschiedene Komplexsysteme ausgewählt. Dies wiederum erforderte eine Optimierung der wichtigsten MS-Parameter auf jedes einzelne Komplexsystem. Insbesondere die Einstellungen des Spray-Modus mussten auf die Eigenschaften der Messproben und die verwendeten Lösemittel abgestimmt werden.

Die Komplexdetektion kann durch die Variation der Kapillarspannung, Cone-Spannung und RF-Lens verbessert werden. Exemplarisch wird im Folgenden die Vorgehensweise einer Methodenoptimierung für einen Protein-Ligand-Komplex [*Lys*(GlcNAc<sub>3</sub>)] sowie für einen Peptid-Peptid-Komplex [(VSV wt)<sub>2</sub>] erläutert.

Die Effizienz des Ionentransfers in die Gas-Phase kann über die Anpassung der Kapillarspannung gesteigert oder verringert werden. Da die am Ende der Transferkapillare angelegte Kapillarspannung (siehe Kapitel 1.2.1, Abb. 8) die Ionen auf ihrem Weg ins Massenspektrometer beschleunigt, treten aufgrund einer erhöhten Potentialdifferenz mehr Ionen in die Gas-Phase über.

Eine verbesserte Sensitivität aller in der Lösung vorhandener Ionen ist die Folge. Wird eine zu hohe Spannung angelegt, so werden die Ionen teilweise fragmentiert und die Transfereffizienz intakter Komplexe bricht schlagartig ein. Durch eine graduelle Erhöhung der Spannung konnte die bestmögliche Einstellung ermittelt werden, bei welcher ein maximaler Ionentransfer und eine optimale Sensitivität erzielt werden konnte. In Abb. 14 a und b sind die  $m/z$ -Bereiche der 8-fach geladenen  $[\text{Lys}(\text{GlcNAc}_3)_n]$ -Komplexe (mit  $n = 1-5$ ) bei zwei unterschiedlichen Kapillarspannungen dargestellt.

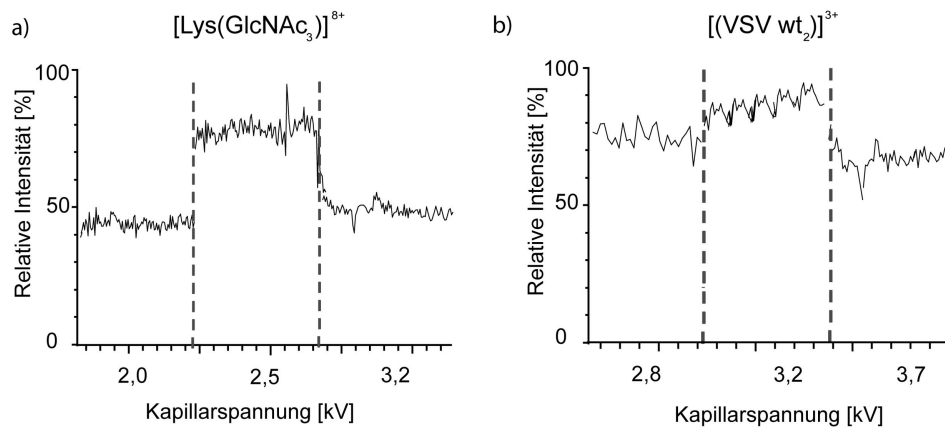


**Abb. 14 : MS-Spektren ( $m/z$ -Bereich 1'700-2'400, 100% = 2'700) einer  $[\text{Lys}(\text{GlcNAc}_3)]$ -Lösung bei verschiedenen Kapillarspannungen. a) 2,0 kV. b) 2,5 kV. Der dargestellte  $m/z$ -Bereich umfasst alle detektierbaren  $[\text{Lys}(\text{GlcNAc}_3)_n]^{8+}$ -Komplexe.**

Es zeigte sich, dass durch eine Erhöhung der Kapillarspannung von 2,0 kV (Abb. 14 a) auf 2,5 kV (Abb. 14 b) eine Intensitätssteigerung für die verschiedenen Komplexe erzielt wurde. Durch die Erhöhung der Kapillarspannung konnte in diesem Fall eine verbesserte Komplexdetektion erzielt werden.

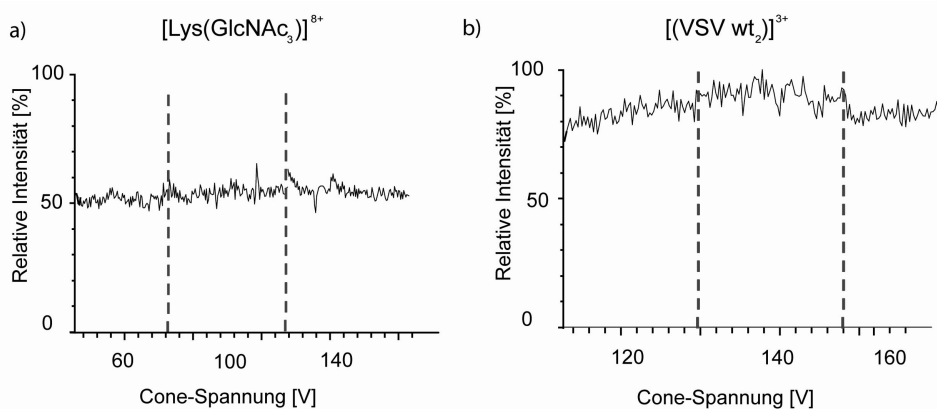
Um den Einfluss der MS-Parameter über einen größeren Varianzbereich besser beobachten zu können, ist eine andere Betrachtungsweise sinnvoller. Mit Hilfe des EICs (*extracted ion chromatograms*) kann die Intensität eines einzelnen Ions über die gesamte Messzeit dargestellt werden. Wird während dieser Messung ein Geräteparameter stufenweise variiert, kann dies häufig in den EICs durch eine Intensitätsab- oder -zunahme beobachtet werden. Ein solches Chromatogramm ist in Abb. 15 a für den Lysozym-Ligand-Komplex und in Abb. 15 b für das VSV wt-Dimer dargestellt.

Durch die Erhöhung der Kapillarspannung konnten im EIC beider Komplexe Intensitätsveränderungen wahrgenommen werden, wobei sich in Folge einer steigenden Kapillarspannung eine Signalerhöhung in den EICs verzeichnen ließ. Da sich diese bei einem zu starken Spannungsanstieg wieder verschlechterte, wurden für die Messungen mit Lysozym eine Spannung von 2,5 kV und für die VSV-Komplexe eine Spannung von 3,2 kV gewählt.



**Abb. 15: Chromatogramme der einzelnen Komplexsignale (EICs), die zur Optimierung der Kapillarspannung herangezogen wurden.** a)  $[\text{Lys}(\text{GlcNAc}_3)]^{8+}$  b)  $[(\text{VSV wt}_2)]^{3+}$ .

Die Cone-Spannung beschleunigt die Ionen in Richtung Massenspektrometer. Durch die Veränderung dieser Spannung konnte die Sensitivität der Komplexdetektion weiter verbessert werden. In Abb. 16 wird der Einfluss der Cone-Spannung auf die Komplexdetektion ersichtlich. Dieser Einfluss war im Falle der hier dargestellten Komplexe weniger ausgeprägt, als bei der Erhöhung der Kapillarspannung. Das EIC des Lysozym-Komplexes wies im untersuchten Spannungsfenster von 60-140 V keinerlei Veränderungen auf (Abb. 16 a). Aus diesem Grund wurde eine mittlere Einstellung der Cone-Spannung (100 V) für die massenspektrometrischen Untersuchungen verwendet.

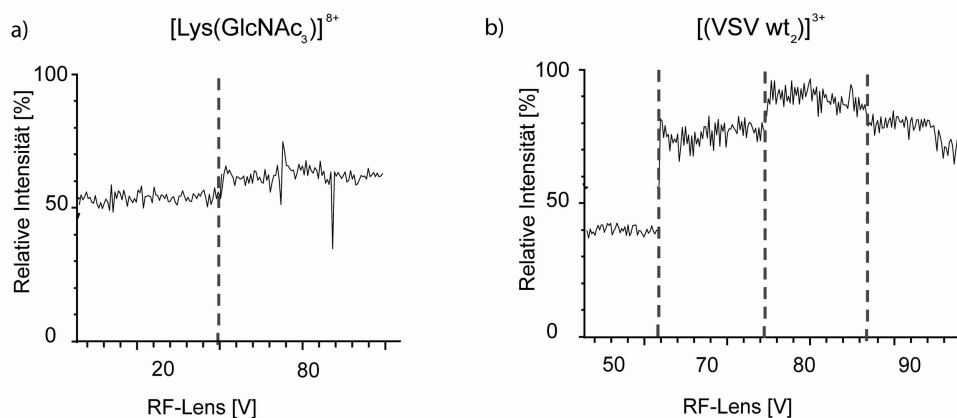


**Abb. 16: Chromatogramme der einzelnen Komplexsignale (EICs), die zur Optimierung der Cone-Spannung herangezogen wurden.** a)  $[\text{Lys}(\text{GlcNAc}_3)]^{8+}$  b)  $[(\text{VSV wt}_2)]^{3+}$ .

Im Falle des VSV-Peptids konnte im EIC der Dimere durch die Erhöhung der Cone-Spannung bis auf 140 V zunächst eine leichte Zunahme der Intensität verzeichnet werden (Abb. 16 b). Eine

weitere Steigerung der Cone-Spannung auf 160 V bewirkte eine Abnahme der Intensität, weshalb die MS-Messungen der VSV-Peptide bei 140 V durchgeführt wurden.

Die RF-Lens ist eine Spannung, welche ebenfalls im Zuge der Methodenoptimierung berücksichtigt wurde. Die zur Ionenfokussierung am Ionentunnel (Q0) angelegte, radiofrequente Spannung bewirkt durch ihre Erhöhung eine Steigerung der Ionendetektion. Die Komplexsignalintensitäten waren sowohl für Lysozym als auch für das VSV-Dimer bei 80 V maximal (Abb. 17).

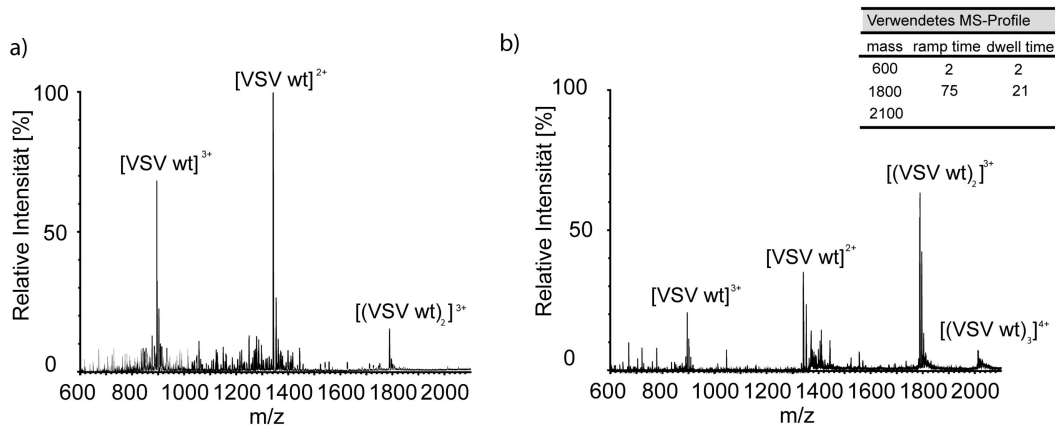


**Abb. 17: Chromatogramme der einzelnen Komplexsignale (EICs), die zur Optimierung der RF-Lens herangezogen wurden.** a) [Lys(GlcNAc<sub>3</sub>)]<sup>8+</sup> b) [(VSV wt<sub>2</sub>)]<sup>3+</sup>.

Die Temperatur des Trocknungsgases sowie dessen Fluss nimmt über die Effizienz der Tröpfchentrocknung indirekt Einfluss auf die Detektion der Signale. Wässrige Lösemittel benötigen in der Regel einen höheren Gasfluss und eine höhere Temperatur, um die Tröpfchen optimal zu trocknen. Ein solches Lösemittel kam bei der Probenherstellung der Lysozymlösungen zum Einsatz, weshalb die Einflüsse des Trocknungsgases mit der Lysozymprobe analysiert wurden. Weder durch eine Erhöhung der Temperatur noch durch eine Erhöhung des Gasflusses konnte die Intensität der Lysozym-Komplexe gesteigert werden. Demzufolge wurden diese Parameter für alle hier untersuchten Komplexe mit ihren Standardeinstellungen verwendet.

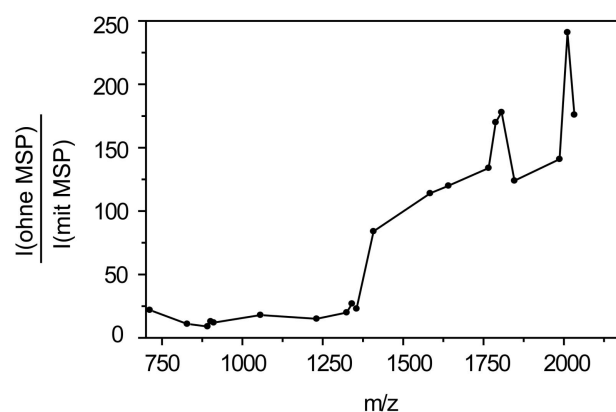
Eine Verbesserung der relativ geringen Signalintensität der VSV-Dimere konnte durch eine erhöhte RF-Spannung des ersten Quadrupols (Q1) erzielt werden. Unter normalen, massenauflösenden Bedingungen ist die Gleichspannung des Quadrupols auf Null gesetzt und es liegt nur die RF-Spannung an. Aus diesem Grund werden nur Ionen eines kleinen m/z-Bereichs transmittiert und gerade schwerere und schlecht detektierbare Signale können auf ihrem Weg in Richtung TOF gänzlich verloren gehen. Ein größerer m/z-Bereich kann durch eine stufenweise Erhöhung der RF-Spannung detektiert werden. Dies geschah über die MS-Profil Einstellung. Eine zweistufige Erhöhung (*ramp time*) zusammen mit einer variablen Verweildauer ( *dwell time*) der RF-Spannung ermöglichte ein Abtasten des Massebereichs. Dadurch wurden die Intensitäten einiger m/z-Bereiche herab und andere hinauf reguliert. Dies wird in Abb. 18 deutlich, in welcher die

Massenspektren einer VSV-Probe ohne (a) und mit (b) MS-Profil Einstellung einander gegenüber gestellt sind. Während Signale im unteren und mittleren m/z-Bereich einen Intensitätsverlust verzeichneten (Monomerbereich), wurde die Signalintensität im oberen m/z-Bereich (Dimerbereich) verstärkt.



**Abb. 18: MS-Spektren (m/z-Bereich 600-2'100, 100% = 11'200) einer VSV wt-Lösung ohne bzw. mit Verwendung der MS-Profil Einstellung.** Während der Monomer m/z-Bereich (m/z 600-1'300) Intensitätseinbußen verzeichnet, gewinnt der Oligomerbereich (ab m/z 1'300) an Intensität. Gewählte MS-Profil Einstellung ist der Tabelle in Abb. 18 b zu entnehmen.

Der Umschlagpunkt zwischen Signalverringern und Signalernhöhung des verwendeten MS-Profiles konnte bei der verwendeten Einstellung der VSV-Lösungen einem m/z-Wert von etwa 1'300 zugeordnet werden. Signale im unteren m/z-Bereich mussten Intensitätseinbußen von etwa 75% hinnehmen, Signale im höheren m/z-Bereich gewannen an Intensität. Dies wird in Abb. 19 verdeutlicht. In dieser Abbildung wurden die Intensitäten der Signale einer Messung mit MS-Profilen relativ zu den Intensitäten derselben Signale ohne MS-Profil dargestellt. Sind die Signalintensitäten mit und ohne MS-Profil Einstellung gleich, so entspricht dies dem Wert 100. Signale mit einem Wert unter 100 erfahren einen Intensitätsverlust, während Signale über 100 einen Intensitätsgewinn verzeichnen.



**Abb. 19: Veränderung der Signalintensitäten bei Verwendung einer MS-Profil Einstellung im Vergleich zu den Signalintensitäten ohne MS-Profil.** Zur Erstellung des Graphen wurden die Monomer- und Oligomerintensitäten verschiedener VSV-Peptide mit (=I (MSP)) und ohne (=I (ohne MSP)) MS-Profil Einstellung verwendet (A16, GpA, VSV wt, VSV G6,10A, VSV V2T,F14L). m/z-Werte, die einen Wert von 100 aufweisen, erfahren keine Änderung der Signalintensität.

### 4.3 Charakterisierung von Peptid-Peptid-Interaktionen

In der hier vorliegenden Arbeit erfolgte die Charakterisierung der nichtkovalenten Komplexe mit Hilfe der Massenspektrometrie in der Gas-Phase. Wird das Massenspektrometer lediglich als Detektionsmethode eingesetzt, eignet sich diese Technik auch dazu, Veränderungen der Flüssig-Phase wahrzunehmen. Unterschiede in der Lösungszusammensetzung, wie zum Beispiel durch Variation der Konzentrationen oder des Lösemittels, lassen sich massenspektrometrisch als Flüssig-Phasen-Veränderungen nachweisen. Diese Detektionsmethode kam im nachfolgenden Teil bei der Charakterisierung der Komplexeigenschaften zum Einsatz. In allen Experimenten wurden Veränderungen in der Flüssig-Phase durchgeführt, welche dann in der Gas-Phase detektiert und charakterisiert wurden. Besonderes Interesse galt dabei der Motivspezifität von Peptiden sowie der Ausbildung spezifischer Wechselwirkungen in Folge der Oligomerisierung. Auch die Frage, wie sich die Hämgruppe als Cofaktor auf die Oligomerisierung spezieller Peptide auswirkt, wurde adressiert.

#### 4.3.1 Hydrophobe VSV-Peptide

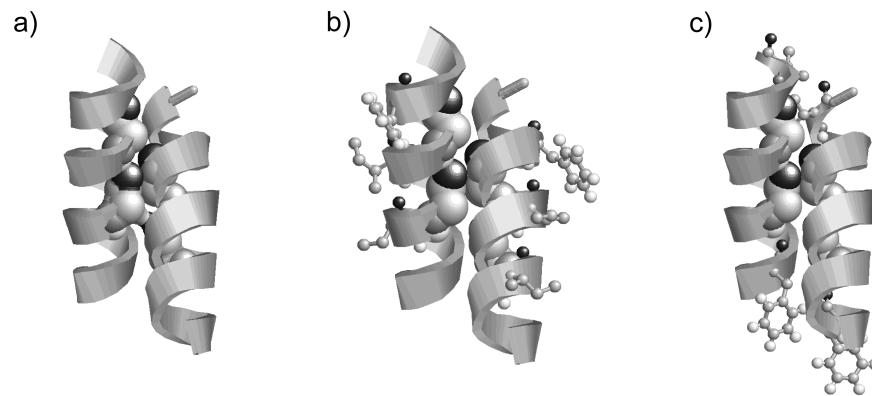
##### 4.3.1.1 Design der VSV-Peptide

Die Basis der verwendeten Peptide bildete die VSV wt-Sequenz, welche aus 15 Aminosäuren des G-Protein Transmembransegments (TMS) aufgebaut ist und das GxxxG-Interaktionsmotiv beinhaltet. Es wurden VSV wt-Varianten verwendet, in denen ein (VSV G6A, VSV G10A) oder beide (VSV G6,10A) Glycinreste zu Alanin ausgetauscht wurden. Daneben standen Mutanten mit intaktem GxxxG-Motiv (VSV A3 und VSV V2T,F14L) zur Verfügung (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Aminosäuresequenzen der verwendeten VSV-Peptide.**

	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1							
Tetradenmotiv	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b							
A16	K	K	K	W	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	K	K	K				
GpA	K	K	K	W	T	L	I	I	F	G	V	M	A	G	V	I	G	T	I	K	K	K
VSV wt	K	K	K	W	F	F	F	I	I	G	L	I	I	G	L	F	L	V	L	K	K	K
VSV A3	K	K	K	W	F	F	F	<b>A</b>	I	G	L	<b>A</b>	I	G	L	<b>A</b>	L	V	L	K	K	K
VSV G6A	K	K	K	W	F	F	F	I	I	G	L	I	I	<b>A</b>	L	F	L	V	L	K	K	K
VSV G10A	K	K	K	W	F	F	F	I	I	<b>A</b>	L	I	I	G	L	F	L	V	L	K	K	K
VSV G6,10A	K	K	K	W	F	F	F	I	I	<b>A</b>	L	I	I	<b>A</b>	L	F	L	V	L	K	K	K
VSV V2T, F14L	K	K	K	W	F	<b>L</b>	F	I	I	G	L	I	I	G	L	F	L	<b>T</b>	L	K	K	K

Das GxxxG-Motiv befindet sich aufgrund des Tetradenmusters [abcd]<sub>n</sub> in der Helixkontaktfläche. Durch den Austausch dieser Aminosäuren können mögliche Interaktionen zwischen den Helices verändert werden. Eine eigens durchgeführte Modellierung mit der Software *Chi* ergab für die VSV wt Sequenz eine dem Glykophorin A ähnliche Struktur (Abb. 20 a-c). Mit dieser lassen sich die eingeführten Mutationen eingehend erklären. Die Positionen 6 und 10, an welchen sich im Wildtyp (Abb. 20 a) die Glycinreste befinden, sind im Modell als voluminöse Kugeln dargestellt. Sie positionieren sich in der Kontaktfläche und begünstigen durch die fehlenden Seitenketten die Zusammenlagerung der beiden Helices. In Abb. 20 b sind zusätzlich die Positionen (*ball and stick* Darstellung) hervorgehoben, welche in der dargestellten Wildtypsequenz verändert wurden, um die VSV A3-Mutante zu erhalten. Es wird deutlich, dass die Positionen, an denen die Alaninreste eingeführt wurden, auf der Helixrückseite liegen und somit keinen Einfluss auf die Interaktion ausüben. Dagegen wurden in der VSV V2T,F14L-Mutante wiederum a-Positionen in der Kontaktfläche ausgetauscht (Abb. 20 c).



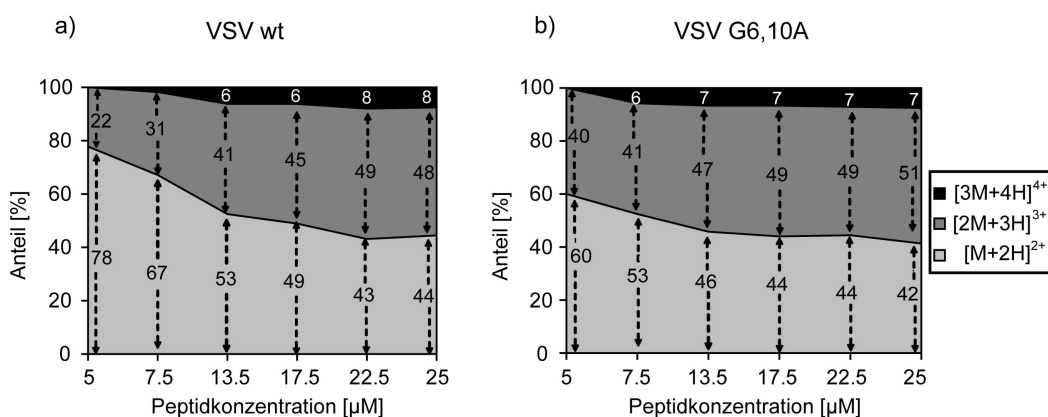
**Abb. 20 a-c: Modell eines VSV-wt-Dimers.** a) Die als voluminöse Kugeln dargestellten Glycinreste ermöglichen den Helices aufgrund der fehlenden Seitenketten eine optimale Annäherung. b) Neben den Glycinresten sind in der Struktur des VSV wt die Positionen hervorgehoben, welche im VSV A3-Peptid gegenüber der VSV wt-Sequenz verändert wurden (*ball and stick* Darstellung). c) Die VSV V2T,F14L-Mutante wurde erhalten, indem in der dargestellten VSV wt-Struktur die hervorgehobenen Aminosäuren ausgetauscht wurden. Struktur generiert mit CHI.

Die Löslichkeit der hydrophoben TMSs konnte durch den Einbau von drei Lysinresten an beiden Enden der Sequenz verbessert werden. Des Weiteren diente ein Tryptophan zwischen den N-terminalen Lysinen und der TMD zur Quantifizierung der Peptide mittels UV/VIS-Spektroskopie.

#### 4.3.1.2 Konzentrationsabhängige Oligomerisierung

Die Charakterisierung der motivabhängigen Oligomerisierung setzte eine spezifische, von der Peptidkonzentration unbeeinflusste Interaktion von Peptid-Monomeren voraus. Daher wurde der Einfluss der Konzentration auf die Monomer-Oligomer-Zusammensetzung der Peptidlösungen überprüft. Aus nano-Elektrospray-Messungen ist bekannt, dass aufgrund unspezifischer Aggregatbildung die Peptidkonzentration nicht zu hoch gewählt werden darf [82]. Eine Grenze zwischen spezifischer und unspezifischer Aggregatbildung wird für nano-ESI-Messungen bei

50  $\mu\text{M}$  Peptidkonzentration angenommen. Die Effizienz der Tröpfchentrocknung ist bei der Verwendung einer micro-Elektrosprayquelle vergleichsweise geringer, weshalb ein Konzentrationsbereich unter 50  $\mu\text{M}$  ausgewählt wurde. Der verwendete Konzentrationsbereich erstreckte sich von 5  $\mu\text{M}$  bis 25  $\mu\text{M}$ . Ein Spektrum einer VSV wt-Probe bei der Maximalkonzentration in 80% TFE (v/v) mit 4 mM Ammoniumacetat (pH 7,4) wurde bereits in Kapitel 4.2 in Abb. 18 dargestellt. Neben den Monomersignalen in den Ladungszuständen 2+ und 3+ ließen sich auch 3-fach geladene Dimere sowie zu geringen Anteilen auch 4-fach geladene Trimere in der Lösung nachweisen. Die Anteile der 2-fach geladenen Monomere und der detektierbaren Oligomere wurden für jede Peptidkonzentrationen ermittelt und in den nachfolgenden Abbildungen (Abb. 21 a und b) dargestellt. Da sich alle verwendeten VSV-Peptide in der Konzentrationsstudie ähnlich verhielten, wurden exemplarisch nur die Monomer-Oligomer-Zusammensetzungen der VSV wt-Lösung (Abb. 21 a) und die der Doppelmutante VSV G6,10A (Abb. 21 b) dargestellt.



**Abb. 21: Einfluss der Peptidkonzentration auf die Monomer-Oligomer-Anteile.** a) VSV-Probe mit GxxxG-Interaktionsmotiv (VSV wt). b) VSV-Mutante ohne GxxxG-Interaktionsmotiv (VSV G6,10A). Die Summe der Monomer-, Dimer- und Trimerintensitäten wurden für jede Konzentration auf 100% normiert und so die anteilmäßige Zusammensetzung der Peptide bestimmt.

Sowohl für VSV wt als auch für VSV G6,10A konnte durch die Konzentrationszunahme eine Abnahme des Monomeranteils zugunsten einer verstärkten Oligomerisierung beobachtet werden. Ab einer Konzentration von etwa 17,5  $\mu\text{M}$  stellte sich ein konstantes Monomer-Oligomer-Gleichgewicht ein. Dieses wurde unabhängig von der An- oder Abwesenheit eines Oligomerisierungsmotivs bei 17,5  $\mu\text{M}$  erreicht. Bestätigende Ergebnisse konnten im Rahmen der Diplomarbeit von Louisa Mühlberger durch die Anwendung eines kontinuierlichen Konzentrationsgradienten erzielt werden [83].

Geringe Varianzen der Peptidkonzentrationen können bis zu einer Konzentration von 17,5  $\mu\text{M}$  zu großen Unterschieden der Monomer-Oligomer-Verhältnisse führen. Um diese Varianzen zu verhindern, wurde für die nachfolgenden Versuche eine Peptidkonzentration von 25  $\mu\text{M}$  eingesetzt.



#### 4.3.1.3 Lösemittelabhängige Peptideigenschaften

Auch der Einfluss des Lösemittels auf die Komplexbildung wurde untersucht. Die hydrophoben VSV-Peptide ließen sich trotz der eingebauten Lysinreste nicht in rein wässrigen Lösemitteln lösen, weshalb Trifluorethanol (TFE) verwendet wurde. Die Eigenschaft von TFE,  $\alpha$ -helikale Peptidstrukturen zu induzieren und zu stabilisieren war ein weiterer Grund für die Wahl dieses Lösemittels [84]. Auf diese Weise konnte die *in vivo* vorliegende  $\alpha$ -helikale Struktur der Transmembransegmente auch in Lösung induziert werden. Die optimale Lösemittelzusammensetzung wurde für alle Peptide anhand einer TFE-Wasser-Titration bestimmt. Der Helixanteil der Peptide wurde mit Hilfe von Sekundärstrukturbestimmungen über die Zirkular Dichroismus Spektroskopie ermittelt (Abb. 22). Bei der geringsten TFE-Konzentration von 15% wiesen, mit Ausnahme von zwei Peptiden, alle Peptide eine sehr geringe  $\alpha$ -Helikalität von maximal 10% auf. Eine Zunahme der Helikalität ließ sich durch die Steigerung des TFE-Gehalts verzeichnen, was sich mit der Helix induzierenden Eigenschaft des Trifluorethanol erklären lässt. Alle VSV-Peptide erreichten bei einem TFE-Gehalt von 40% ihre maximale Helikalität.

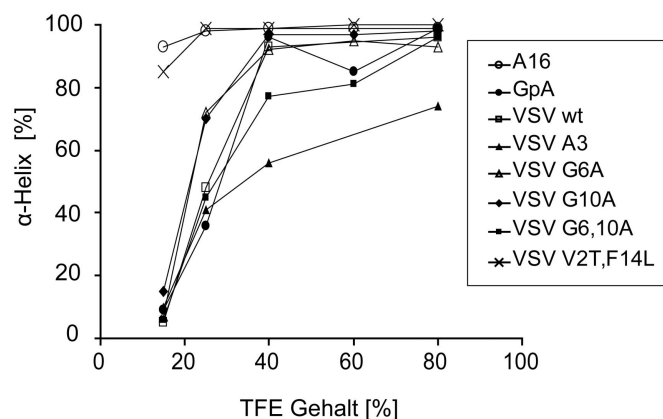


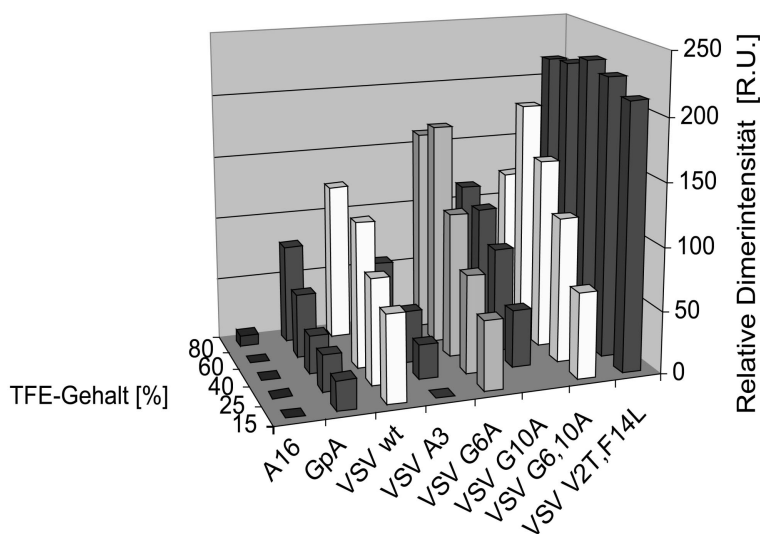
Abb. 22: Helikalität der VSV-Peptide in Abhängigkeit des Trifluorethanol-Gehalts.

Zwei der verwendeten Peptide (A16 und VSV V2T,F14L) zeigten über den gesamten TFE-Konzentrationsbereich eine gleichbleibende  $\alpha$ -helikale Struktur von nahezu 100%. Der hohe Helixanteil des Kontrollpeptids A16 konnte durch theoretische Berechnungen der Sekundärstruktur mit der Software Agadir [85] bestätigt werden. Die theoretische Helikalität der VSV-Peptide in einer rein wässrigen Lösung mit pH 7,4 und einer Ionenstärke von 0,017 M wurde auf Werte zwischen 0,1 und 33,0% bestimmt. Die theoretisch ermittelte Helikalität für A16 war mit 55,0% gegenüber den anderen Peptiden deutlich erhöht. Des Weiteren deckten sich die Ergebnisse mit früheren Berechnungen von Baldwin, welcher eine erhöhte Helikalität von Alanin dominierten Peptiden beobachten konnte [86].

Die Doppelmutante VSV V2T,F14L verhielt sich hinsichtlich der vom Lösemittel abhängigen Helikalität ähnlich dem A16, obwohl es in seiner Aminosäuresequenz eher dem VSV wt gleicht.

Lediglich zwei Aminosäuren wurden gegenüber der VSV wt-Sequenz mutiert. Hiervon waren Valin in Position 2 und Phenylalanin in Position 14 betroffen. Anstelle von Valin wurde Threonin in die Sequenz eingebaut – eine Aminosäure, welche aufgrund ihrer Hydroxylgruppe zur Ausbildung zusätzlicher intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen befähigt ist und so die helikale Struktur stabilisieren kann [87]. Phenylalanin wurde durch die als Helix induzierend bekannte Aminosäure Leucin ersetzt [18]. Durch den Einbau zweier Helix-stabilisierender Aminosäuren scheint eine stabilere und starrere Konformation ausgebildet worden zu sein, weshalb sich die Peptide VSV wt und VSV V2T,F14L in TFE-Titrationsstudien hinsichtlich ihrer Faltung sehr unterschiedlich verhielten.

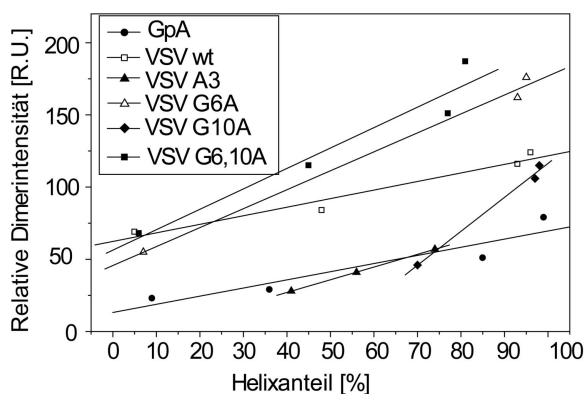
Neben der TFE-abhängigen Helikalität wurde auch die Oligomerisierung bei unterschiedlichen TFE-Konzentrationen untersucht. Die Dimeranteile der jeweiligen TFE-Wasser-Mischungen sind der Abb. 23 zu entnehmen. Hierfür kamen die gleichen Proben zum Einsatz, wie sie bereits für die Bestimmung der Sekundärstruktur verwendet wurden. Die in wässrigen Lösungen (15% TFE) geringe Dimerintensität steigerte sich durch die Erhöhung des TFE-Gehalts, wobei die maximale Intensität ab einer TFE-Konzentration von 40-60% TFE erreicht wurde.



**Abb. 23: Dimeranteile der VSV-Mutanten in Abhängigkeit der TFE-Konzentration.** Mit zunehmender TFE-Konzentration steigt der detektierbare Dimeranteil (relativ zu den jeweiligen 2-fach geladenen Monomeren) an. Analog zu den mittels CD-Messungen bestimmten Helikalitäten flachen die Dimeranteile ab einem bestimmten TFE-Gehalt (40-60%) ab. Bei der VSV V2T,F14L Doppelmutante sowie bei A16 wird ähnlich den Strukturbestimmungen ein anderes Verhalten beobachtet.

Für die Peptide VSV V2T,F14L und A16 wurde ein anderes Verhalten beobachtet. A16 zeigte lediglich eine marginale Oligomerisierung mit einem Anteil von maximal 10. Für die VSV-Mutante VSV V2T,F14L konnte während des gesamten TFE-Bereichs eine hohe und konstante Dimerisierung beobachtet werden.

Auffällig war, dass die Oligomerisierung ähnlich von der TFE-Wasser-Zusammensetzung beeinflusst wurde, wie die Sekundärstruktur der VSV-Peptide. Beide Peptideigenschaften wurden durch den Zusatz von TFE erhöht und erreichten bei einer TFE-Konzentration von 40% ein Maximum. Durch dieses Verhalten wurde ein Zusammenhang zwischen der Oligomerisierung und der Helikalität der Peptide vermutet. Die Tatsache, dass gerade zwei Peptide, A16 und VSV V2T,F14L in beiden Peptideigenschaften ein anderes Verhalten aufwiesen, bekräftigte die Vermutung des Zusammenhangs. Eine Bestätigung konnte durch die Auftragung der Helikalität gegen den Oligomeranteil erzielt werden (Abb. 24). Aufgrund des hohen Helixgehalts von A16 und VSV V2T,F14L und der gleichbleibend niedrigen bzw. hohen Oligomerisierung der Peptide wurden diese nicht in die Korrelation einbezogen. Alle anderen Peptide zeigten ein nahezu lineares Verhalten zwischen der Helikalität und der Oligomerisierung.



**Abb. 24: Linearer Zusammenhang zwischen dem Helix- und dem Dimeranteil der VSV-Peptide.** Eine hohe Dimerisierung kann nur bei einer korrekten Faltung (hohe Helikalität) beobachtet werden. Dennoch ist eine hohe Helikalität keine hinreichende Bedingung für eine hohe Dimerisierung (vgl. A16, nicht in der Korrelation enthalten).

Die Güte der Korrelation wurde durch die Bestimmung verschiedener Korrelationsfaktoren untersucht. Diese Faktoren sind in der Tabelle 4 zusammengefasst. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  sowie der daraus berechnete Korrelationskoeffizient  $r_1$  weisen mit Werten von  $0,89 \pm 0,14$  beziehungsweise  $0,94 \pm 0,08$  auf einen sehr guten Zusammenhang zwischen beiden Größen hin. Die Berechnung des Pearson-Koeffizienten  $r_2$  bestätigte die Korrelation zwischen den beiden Peptid-Eigenschaften.

Durch einen Abgleich der ermittelten Faktoren mit einem Vertrauenswert ( $|r|$ ) von 5% [88] konnte die eigentliche Güte der Korrelation bestimmt werden. Mit Ausnahme von 2 Peptiden (GpA und VSV G6A) lagen alle Koeffizienten im 5%-Bereich, was auf eine gute Korrelation hindeutete. Während sich die ermittelten Koeffizienten für das GpA in einen Vertrauensbereich von 10% einordnen ließen, lagen die Koeffizienten des VSV G6A außerhalb des 5%- sowie des 10%-Bereichs.

**Tabelle 4: Koeffizienten der Korrelation zwischen Dimeranteil und der Helikalität.**

Peptide	m <sup>[a]</sup>	R <sup>2</sup> <sup>[b]</sup>	r <sub>1</sub> <sup>[c]</sup>	r   <sup>[d]</sup>	r <sub>2</sub> <sup>[e]</sup>
GpA	0,56	0,87	0,93	0,95	0,93
VSV wt	0,60	0,96	0,98	0,95	0,98
VSV A3	0,90	0,99*	0,99*	0,99*	0,99*
VSV G6A	1,01	0,62	0,78	0,95	0,85
VSV G10A	2,34	0,99	0,99*	0,99*	0,99*
VSV G6,10A	1,41	0,93	0,97	0,95	0,97

[a]:  $y = mx + b$ [b]:  $R^2$  = Bestimmtheitsmaß[c]:  $r_1 = (R^2)^{1/2}$  = Korrelationskoeffizient

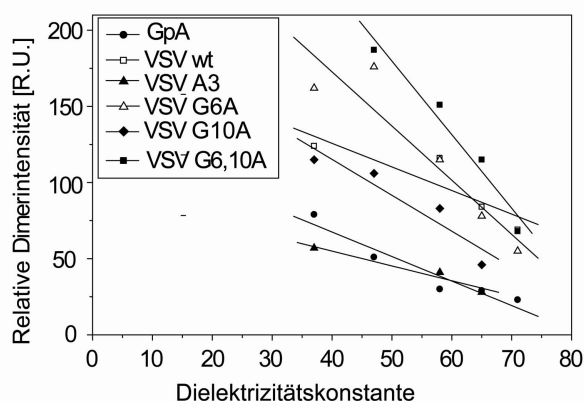
[d]: | r | = 5% Vertrauenswert [88]

[e]: r<sub>2</sub> = Pearson-Koeffizient

\* besser als 0,99

Die Korrelation dieser Daten zeigte, dass eine gute Oligomerisierung direkt mit der Ausbildung einer helikalen Struktur einhergeht. Eine korrekte Faltung der Peptide ist somit eine wichtige Voraussetzung für die Oligomerisierung. Des Weiteren kann davon ausgegangen werden, dass die Flüssig-Phasen-Sekundärstruktur zumindest teilweise in der Gas-Phase erhalten bleibt.

Mit der Varianz der Lösemittelzusammensetzung wurde eine weitere Größe, die Dielektrizitätskonstante des Mediums verändert. Gross *et al.* postulierten 2004 einen Zusammenhang zwischen der Gas-Phasen-Oligomerisierung von Gramicidin und der Dielektrizitätskonstante des verwendeten Mediums [89]. Eine Erhöhung der Dielektrizitätskonstante im Bereich von 19-28 wurde von einer Verringerung der Oligomerisierung begleitet. Der Dielektrizitätskonstantenbereich in der hier vorliegenden Arbeit lag aufgrund der relativ hohen Dielektrizitätskonstante des Wassers ( $\epsilon = 79$ ) in einem höheren Bereich als der von Gross untersuchte. Der Einfluss der Dielektrizitätskonstante auf die Oligomerisierung der VSV-Peptide ist in Abb. 25 dargestellt. In der Abbildung wurden die Dimeranteile der verschiedenen TFE-Lösungen gegen die entsprechende Dielektrizitätskonstante des Mediums aufgetragen. Die Dielektrizitätskonstanten der TFE-Wasser-Mischungen wurden mit der von Gross publizierten Formel berechnet, obwohl deren Gültigkeit lediglich für Medien mit vergleichbaren Dielektrizitätskonstanten angesetzt wurde [89]. Da die berechneten Dielektrizitätskonstanten denen von Hong *et al.* publizierten Konstanten für TFE-Wasser-Mischungen gleichen, konnte damit die Anwendung der Formel gerechtfertigt werden [84].



**Abb. 25: Linearer Zusammenhang zwischen dem Dimeranteil und der Dielektrizitätskonstante des Mediums.** Die Dielektrizitätskonstante wurde nach der von Gross publizierten Formel ( $\epsilon = \epsilon_1 v_1 + \epsilon_2 v_2$ ) berechnet.

Die Bestimmung der Korrelationsgüte wurde wie bei der Helix-Dimer-Korrelation durchgeführt und die ermittelten Korrelationsfaktoren in Tabelle 5 zusammengefasst. Ein Vergleich mit dem 5%-Vertrauenswert zeigte eine schlechtere Korrelation zwischen der Dielektrizitätskonstante des Mediums und dem detektierten Dimeranteil. Lediglich für zwei Peptide (GpA, und VSV G6A) war ein direkter Zusammenhang durch die bestimmten Korrelationsfaktoren nachweisbar.

**Tabelle 5: Koeffizienten der Korrelation zwischen Dimeranteil und Dielektrizitätskonstante.**

Peptide	m <sup>[a]</sup>	R <sup>2</sup> <sup>[b]</sup>	r <sub>1</sub> <sup>[c]</sup>	r  <sup>[d]</sup>	r <sub>2</sub> <sup>[e]</sup>
GpA	-1,60	0,92	0,96	0,88	-0,96
VSV wt	-1,56	0,78	0,88	0,95	-,099
VSV A3	-1,00	0,96	0,98	0,99*	-0,98
VSV G6A	-3,54	0,87	0,93	0,88	-0,98
VSV G10A	-2,34	0,89	0,94	0,95	-0,94
VSV G6,10A	-1,89	0,33	0,58	0,88	-0,98

[a]:  $y = mx + b$

[b]: R<sup>2</sup> = Bestimmtheitsmaß

[c]:  $r_1 = (R^2)^{1/2}$  = Korrelationskoeffizient

[d]: |r| = 5% Vertrauenswert [88]

[e]: r<sub>2</sub> = Pearson-Koeffizient

\* besser als 0,99

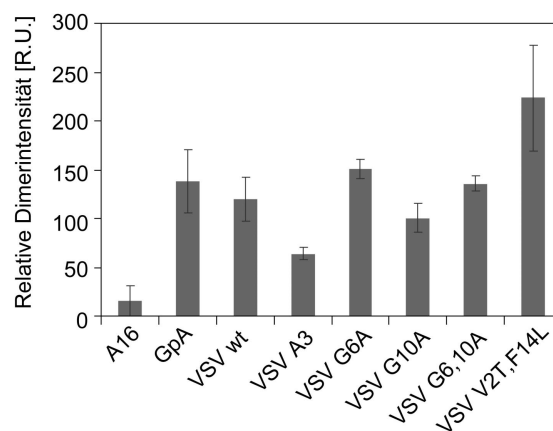
Mit Hilfe der beiden Korrelationen wurde herausgefunden, dass die TFE-abhängige Oligomerisierung im Wesentlichen von der Sekundärstruktur der Peptide und weniger von der Dielektrizitätskonstante des Mediums beeinflusst wird. Als Voraussetzung für eine hohe Oligomerisierung wurde daher die Helikalität der Peptide gefunden. Die helikale Struktur der Peptide konnte durch eine Erhöhung der TFE-Konzentration gesteigert werden – gleiches galt für die Oligomerisierung. Obwohl beide Peptideigenschaften in einer 40%-igen TFE-Lösung bereits

maximal waren, wurde für die nachfolgende, sequenzabhängige Oligomerisierung ein TFE-Gehalt von 80% eingesetzt.

#### 4.3.1.4 Helix-Helix-Interaktion in Abhängigkeit eines Sequenzmotivs

Die bisher aus der TFE- und Konzentrationsstudie gewonnenen Ergebnisse lieferten die Basis für eine detaillierte Untersuchung der VSV-Mutanten. In einer 80%igen TFE-Lösung sollte eine 25  $\mu$ M Peptidlösung frei von Peptid- und Lösemiteleinflüssen sein, so dass sich unterschiedliche Oligomerisierungsmuster auf die An- oder Abwesenheit eines GxxxG-Sequenzmotivs zurückführen lassen.

Der Dimeranteil der verschiedenen VSV-Mutanten, welcher relativ zur Monomerintensität gemessen wurde, ist in Abb. 26 dargestellt. Glykophorin A, welches aufgrund seines GxxxG-Motivs als guter Oligomerisierer bekannt ist, zeigte einen Oligomeranteil von  $135 \pm 32$ . Ein ähnliches Oligomerisierungsverhalten wurde auch für die VSV-Peptide nachgewiesen. Signifikante Unterschiede im Oligomerisierungsanteil waren nicht nachweisbar. Der Anteil lag bei nahezu allen verwendeten Peptiden (ausgenommen VSV V2T,F14L) bei  $115 \pm 30$ .



**Abb. 26: Oligomerisierung der VSV-Varianten im Vergleich zur Oligomerisierung von GpA als Positiv- und A16 als Negativkontrolle.** Das Ausmaß der Interaktionen ist bei allen verwendeten VSV-Peptiden mit dem des GpAs vergleichbar. Lediglich VSV A3 zeigt eine verminderte Oligomerisierung. Die dargestellten Balken beziehen sich auf die massenspektrometrische Intensität des 3-fach geladenen Dimers relativ zu der Intensität des 2-fach geladenen Monomers der jeweiligen Peptide (Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 3-7$ ).

Die Oligomerisierung des VSV A3 war mit  $61 \pm 6$  vergleichsweise gering. Da in der Aminosäuresequenz dieser VSV-Mutante das GxxxG-Motiv konserviert wurde, konnte die verminderte Oligomerisierung nicht auf das Fehlen des Oligomerisierungsmotivs zurückgeführt werden. Wie in Abb. 20 b Kapitel 4.3.1.1 dargestellt, wurden im Vergleich zur Wildtypsequenz drei Aminosäuren auf der Helixrückseite in den c-Positionen des Tetradenmusters mutiert. Diese sollten an einer möglichen Helix-Helix-Interaktion, welche über das GxxxG-Motiv gesteuert wird, nicht

beteiligt sein. Da eine korrekte Faltung der Peptide als Voraussetzung für eine gute Oligomerisierung aufgezeigt wurde, könnte der geringe Dimeranteil der Alaninmutante auf eine fehlerhafte oder nicht vollständige Faltung zurückgeführt werden. Wie bereits in der Abb. 22 in Kapitel 4.3.1.3 beobachtet werden konnte, ist die Helikalität des VSV A3 im Vergleich zu den übrigen VSV-Peptiden gering und die Faltung des Peptids somit nicht optimal. Eine fehlerhafte Charge des VSV A3-Peptids könnte die Fehlfaltung und die verminderte Oligomerisierung erklären.

Das als Negativkontrolle verwendete Alanin-Peptid (A16) wies mit einem Dimeranteil von nur  $16 \pm 13$  die geringste Oligomerisierung auf.

Durch diese Messungen konnte gezeigt werden, dass die Oligomerisierung der VSV-Peptide nicht vom GxxxG-Motiv beeinflusst wird. Werden andere, nicht das GxxxG-Motiv betreffende Aminosäuren in den  $\alpha$ -Positionen des Tetradenmusters ausgetauscht, so kann die Interaktion zwischen den Helices verändert werden. Die im VSV V2T,F14L-Peptid mutierten Aminosäuren befinden sich in diesen Positionen und somit in der Kontaktfläche. Der Dimeranteil der Mutante VSV V2T,F14L lag mit  $224 \pm 54$  deutlich über dem mittleren Anteil der übrigen VSV-Peptide, überstieg die Oligomerisierung des GpA allerdings nicht. Die in Position 2 eingefügte Aminosäure Threonin kann über seine Hydroxylseitenkette einerseits über intramolekulare Wechselwirkungen die helikale Struktur stabilisieren, andererseits über intermolekulare Wechselwirkungen die Dimerbildung begünstigen [87], weshalb eine erhöhte Dimerisierung verzeichnet werden konnte.

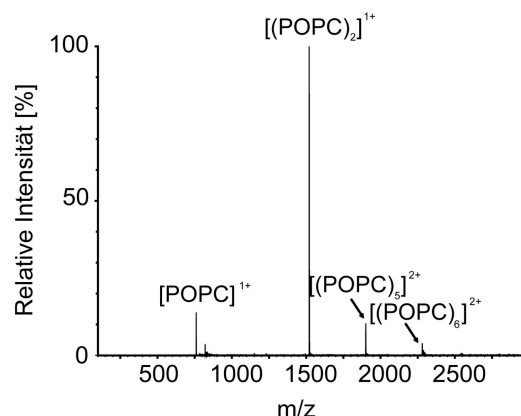
#### 4.3.1.5 Peptid-Peptid-Interaktion in Liposomen

Die bisher aus den massenspektrometrischen Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse konnten die motivspezifische Oligomerisierung, wie sie *in vivo* im ToxR-System gezeigt wurde, nicht bestätigen [30]. Ein möglicher Grund hierfür ist die in der Gas-Phase fehlende Peptid-Umgebung, welche die Eigenschaften der Peptid-Peptid-Oligomerisierung beeinflusst. Um auch für die Gas-Phasen-Analyse der VSV-Oligomerisierung ähnliche Voraussetzungen wie die des ToxR-Systems zu schaffen, wurden die Peptide in Liposomen rekonstituiert. Zur Herstellung kleiner, unilamellarer Vesikel wurde ein 3:1:1-Lipidgemisch aus POPC, DOPE und DOPS eingesetzt. Das Peptid/Lipid Verhältnis betrug 0,01. Die aufgenommenen Massenspektren wurden mit den Signalen des im Überschuss zugesetzten POPCs überdeckt. Dabei konnte im Wesentlichen das 1-fach geladene Monomer und Dimer des POPCs detektiert werden. DOPE, welches wie POPC ebenfalls eine neutrale Kopfgruppe trägt, konnte nicht nachgewiesen werden. Auch DOPS war nicht detektierbar. Dies lässt sich auf die negative Ladung des Phospholipids zurückführen, weshalb es im positiven Ionenmodus nicht beobachtet werden kann.

Die zugesetzten Peptide GpA, VSV wt, VSV G6,10A bzw. VSV V2T,F14L konnten als 2-fach und 3-fach geladene Monomere, nicht jedoch als Peptid-Homo-Dimere oder Peptid-Lipid-Komplexe nachgewiesen werden.

Aufgrund der fehlenden Nachweisbarkeit der Lipide DOPS und DOPE und der fehlenden Oligomerisierung zwischen den genannten Lipiden und den VSV-Peptiden, wurden die Anteile von DOPS und DOPE durch weiteres POPC ersetzt. Ein weiterer Grund für den Austausch des negativ geladenen DOPS-Phospholipids stellte die mögliche Interaktion mit den positiven Lysinresten dar, welche an den beiden Termini der VSV-Peptide eingeführt wurden. Eine solche Interaktion könnte die Oligomerisierung der VSV-Peptide beeinträchtigen und so zu falschen Aussagen führen. Eine Interaktion zwischen positiv geladenen Aminosäuren von VSV-Peptiden und PS konnten bereits Carneiro *et al.* mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie beobachten [90, 91].

Ähnlich wie bei der zuvor vermessenen Lipid-Mischung dominierten bei höherer POPC-Konzentration die Signale von POPC (Abb. 27). Vergleichbar ist das Spektrum in Abb. 27 mit Spektren von WALP-Peptiden in DMPC mit einem geringfügig höheren P/L-Verhältnis von 0,04, wie sie von Demmers *et al.* 2001 publiziert wurden [92].



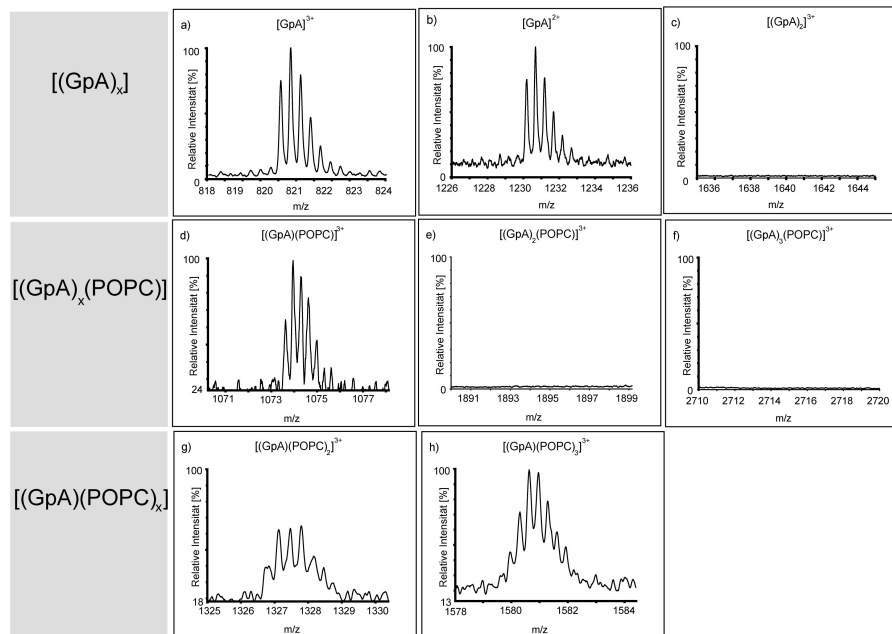
**Abb. 27:** MS-Spektrum (m/z-Bereich 100-3'000, 100% = 24'500) einer in POPC Liposomen rekonstituierten Glykophorin A-Lösung. Es wurde ein P/L Verhältnis von 0,01 verwendet. Die dominierenden Signale lassen sich POPC-Oligomeren zuordnen.

Neben den dominanten Lipidsignalen ließen sich auch Peptidsignale detektieren. Diese sind exemplarisch für Glykophorin A den Abb. 28 a-h zu entnehmen. Da zwischen Glykophorin A und den VSV-Peptiden hinsichtlich der detektierbaren Signale keine Unterschiede zu finden waren, wird im Folgenden nur auf Glykophorin A als Beispiel-Peptid eingegangen.

Neben den 2- und 3-fach geladenen Glykophorin A Monomeren (Abb. 28 a und b) ließen sich nun auch Peptid-Lipid-Komplexe nachweisen. Diese waren aus ein oder mehreren Lipidmolekülen ((POPC)<sub>x</sub> mit x = 1-3) sowie maximal einem Glykophorin A Molekül (Abb. 28 d, g und h) aufgebaut. Höhere GpA-Oligomere mit oder ohne Lipid ließen sich nicht nachweisen (Abb. 28 c, e und f).



Massenspektrometrische Untersuchungen von Killian *et al.* bestätigen die Ergebnisse. Sie konnten ebenfalls Interaktionen zwischen Phospholipiden und einem bakteriellen Kaliumkanal nachweisen. Die eigentliche tetramere Form des Proteins war jedoch nicht detektierbar [93]. Eine eingängige Erklärung konnte auch ihrerseits nicht gefunden werden.



**Abb. 28 a-h:** Oligomer  $m/z$ -Bereiche einer in POPC Lipiden rekonstituierten Glykophorin A Lösung. a) bis c)  $m/z$ -Bereiche für  $[(GpA)_x]$  Signale mit  $x = 1-2$ ; d) bis f)  $m/z$ -Bereiche für  $[(GpA)_x(POPC)]$  Signale mit  $x = 1-3$ ; g) und h)  $m/z$ -Bereiche für  $[(GpA)(POPC)_x]$  Signale mit  $x = 2-3$ ; Es wurde ein P/L Verhältnis von 0,01 eingesetzt. Die 100% Intensitäten der Spektren wurden auf keine gemeinsame Intensität normiert.

Die *in vivo* gefundene GxxxG-Motivspezifität der VSV-Peptide konnte in der Gas-Phase auch durch die Anpassung der Umgebungseigenschaften nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine sequenzabhängige Oligomerisierung in Bezug auf das GxxxG-Motiv in der Gas-Phase nicht nachgewiesen werden konnte. Eine Veränderung der Umgebungsparameter an *in vivo* Bedingungen unterdrückte die Detektion der Oligomere vollständig, weshalb keine Unterschiede zwischen den verschiedenen VSV-Mutanten aufzuzeigen waren. Durch die Korrelation zwischen der Flüssig-Phasen-Sekundärstruktur und der Gas-Phasen-Oligomerisierung zeigte sich, dass Flüssig-Phasen-Eigenschaften zu einem gewissen Anteil in der Gas-Phase erhalten bleiben und so einen Einfluss auf die Gas-Phasen-Eigenschaften ausüben. Daher kann davon ausgegangen werden, dass eine von der Solvathülle beeinflusste Peptidfaltung die Oligomerisierung der Peptide unterstützt und so die Faltung als Voraussetzung für eine gute Interaktion zweier Peptide fungiert.

### 4.3.2 Peptidnukleinsäuren

Interaktionsmotive wie das GxxxG-Motiv stellen nicht die einzige Möglichkeit zur Steuerung von Peptid-Peptid-Interaktionen dar. Im Falle der Peptidnukleinsäuren übernehmen diese Funktion die in den Seitenketten der Aminosäuren eingebauten Nukleobasen. Diese Art der Oligomerisierung wird im Folgenden näher charakterisiert.

#### 4.3.2.1 Design der Peptidnukleinsäuren

Die verwendeten Peptidnukleinsäuren (PNA) sind aus dem kleinsten Vertreter der  $\beta$ -Aminosäuren, dem  $\beta$ -Alanin, aufgebaut. Insgesamt umfasst die Sequenz 13 Aminosäuren, welche an jeder dritten Position durch den Einbau von Nukleinbasen funktionalisiert wurden. Die verbleibenden Positionen besetzten abwechselnd ein AHC-Molekül und  $\beta$ -Homolysin. Die zyklische Aminosäure (1R,2R)-2-Aminocyclohexancarbonsäure (ACHC) unterstützte aufgrund ihrer eingeschränkten Konformation die Ausbildung der 14-Helix.  $\beta$ -Homolysin diente zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit. Das C-terminale Ende der Peptidkette lag als Säureamid vor und war bei einem pH-Wert von 7,0 ungeladen.

Die verwendeten Peptidnukleinsäuren werden durch die in ihrer Sequenz enthaltenen Nukleinbasen abgekürzt. Einen Überblick über die zur Verfügung stehenden Sequenzen liefert Tabelle 6. Unter den PNAs existieren zwei PNA-Paare, welche sich nicht in der Art der enthaltenen Nukleinbasen, sondern in ihrer Sequenzabfolge unterscheiden. So erhält man ATCA aus der Sequenz des ACTA, indem man die mittleren Positionen vertauscht. Gleiches gilt für TAGT und TGAT.

**Tabelle 6: Verwendete Peptidnukleinsäuren.**

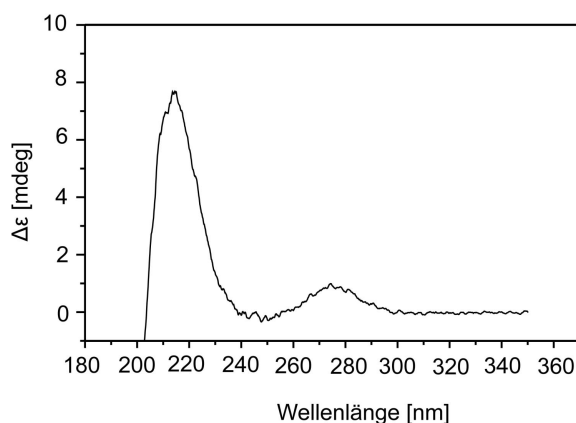
PNA	MW [Da]
ACGT	2'013,45
ACTA	1'997,45
<u>ATCA</u>	1'997,45
TAGT	2'026,64
<u>TGAT</u>	2'026,64

#### 4.3.2.2 Bestimmung der Sekundärstruktur der Peptidnucleinsäuren

Wie bereits durch die Versuche der VSV-Peptide ersichtlich wurde, ist ein korrekter Faltungszustand eine wichtige Voraussetzung für die Bildung von Oligomeren. Aus diesem Grund wurden auch für die Peptidnucleinsäuren die Sekundärstrukturanteile mittels Zirkular Dichroismus bestimmt. In der Literatur sind CD-Spektren für Hexa- und Heptapeptide beschrieben, welche ein typisches Maximum bei 195 nm und ein Minimum bei 215 nm aufweisen. NMR-Studien und kristallographische Untersuchungen bewiesen das Vorhandensein einer linksgängigen 14-Helix dieser Peptide. Bei rechtsgängigen 14-Helices sind Minima und Maxima vertauscht [36, 94].

In Abb. 29 ist das CD-Spektrum einer ACTA-Lösung abgebildet, welches den für die Ausbildung von 14-Helices typischen Cotton-Effekt bei 215 nm zeigt. Die Detektion eines Maximums bei 215 nm weist auf die Ausbildung einer rechtsgängigen Helix hin. Das zweite, weniger stark ausgeprägte Maximum bei etwa 270 nm kann keinem bekannten Effekt der 14-Helix zugeordnet werden. Die Forschungsgruppe von Diederichsen in Göttingen beobachtete dieses Maximum ebenfalls bei den von ihnen durchgeführten CD-Messungen. Bisher ist dieser Effekt nicht eindeutig geklärt. Mögliche Erklärungen könnten auf die Ausbildung einer bevorzugten Orientierung der Nucleobasen in Bezug auf das chirale  $\beta$ -Peptidrückgrat zurückgeführt werden. Ebenso könnten Basenpaarungen in Doppelsträngen oder Stapelungswechselwirkungen innerhalb einer einzelnen 14-Helix für die Detektion des zweiten Maximums verantwortlich sein [95].

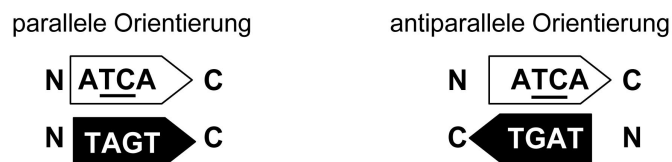
Die Sekundärstrukturen der anderen, zur Verfügung stehenden Peptidnucleinsäuren konnten ebenfalls als rechtsgängige 14-Helix identifiziert werden.



**Abb. 29: Sekundärstruktur einer 5  $\mu$ M ACTA-Probe in 5 mM Ammoniumacetat pH 7,0.** Durch den stark ausgeprägten Cotton-Effekt bei 215 nm konnte die Ausbildung einer 14-Helix eindeutig nachgewiesen werden. Das zweite, weniger stark ausgeprägte Maximum bei 270 nm wurde auch von der Forschungsgruppe von Prof. Diederichsen beobachtet, dessen Auftreten konnte bis dato noch nicht eindeutig geklärt werden [95].

#### 4.3.2.3 Bevorzugte Strang-Orientierung der Peptidnukleinsäuren bei der Oligomerisierung

Um die Oligomerisierung der Peptidnukleinsäuren exakt charakterisieren zu können, spielt neben der richtigen Sekundärstruktur auch die Kenntnis über die Strang-Orientierung bei der Oligomerisierung eine entscheidende Rolle. Die beiden Einzelstränge können sich auf zwei verschiedene Weisen zusammenlagern. Zum Einen können die jeweiligen N- bzw. C-Termini beider Helices übereinander liegen (parallele Paarung), zum Anderen ist auch der umgekehrte Fall denkbar. Der N-Terminus der einen Helix paart sich dann mit dem C-Terminus der Anderen und umgekehrt, was eine antiparallele Orientierung der Stränge zur Folge hat. Die Kenntnis der Stranganordnung spielt bei der Ermittlung der Wasserstoffbrückenbindungsanzahl und beim Stabilitätsvergleich verschiedener PNAs eine entscheidende Rolle. Für ein Hetero-Dimer aus ATCA und TAGT sollen die unterschiedlichen Oligomerisierungsmuster genauer erläutert werden (Abb. 30).



**Abb. 30: Mögliche Strang-Orientierungen bei einer Hetero-Oligomerisierung von ATCA und TAGT.** Bei der parallelen Oligomerisierung können 9 komplementäre Basenpaarungen zwischen den beiden Einzelsträngen ausgebildet werden. Im Falle einer antiparallelen Orientierung wird das Hetero-Dimer nur über 4 Interaktionen stabilisiert.

Bei einer parallelen Paarung würde das Hetero-Dimer insgesamt über neun Watson-Crick-Basenpaarungen stabilisiert werden, während sich bei der antiparallelen Orientierung der beiden Stränge lediglich vier Wasserstoffbrücken ausbilden könnten. Eine parallele Orientierung wäre somit für das Hetero-Dimer aufgrund einer höheren Wasserstoffbrückenbindungsanzahl günstiger, die antiparallele Orientierung hingegen mit nur vier Interaktionen ungünstiger. Dennoch muss die Orientierung der Helices nicht über die Anzahl der möglichen Watson-Crick-Basenpaarungen reguliert werden. Es wäre auch denkbar, dass es für alle Peptidnukleinsäuren einen bevorzugten Paarungsmodus gibt. Entweder antiparallel oder parallel.

Im Folgenden soll herausgefunden werden, ob die PNAs eine bevorzugte Orientierung der Stränge bei der Oligomerisierung einnehmen, oder ob sie sich immer gemäß den maximal möglichen Wasserstoffbrückenbindungen zusammenlagern. Hierzu wurden Peptide verwendet, welche sich in der Reihenfolge der enthaltenen Nukleobasen unterscheiden. Jeweils zwei der Peptide haben spiegelbildliche Nukleobasensequenzen und können nur mit einem der anderen PNAs entweder über die parallele bzw. antiparallele Orientierung der Stränge eine vollständige, komplementäre Basenpaarung ausbilden. Aufgrund der enthaltenen Basen sind die verwendeten PNAs nicht zur komplementären Selbstkomplexierung befähigt.

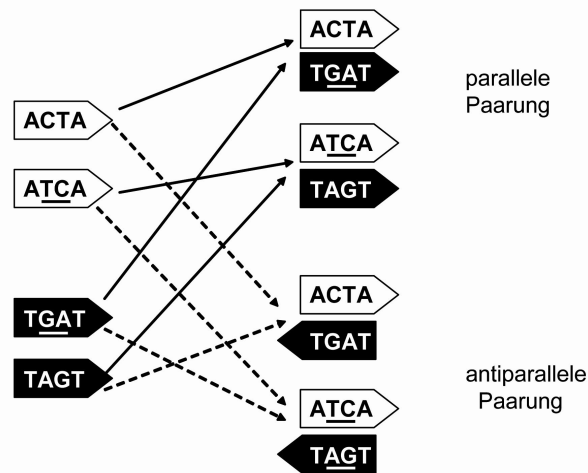
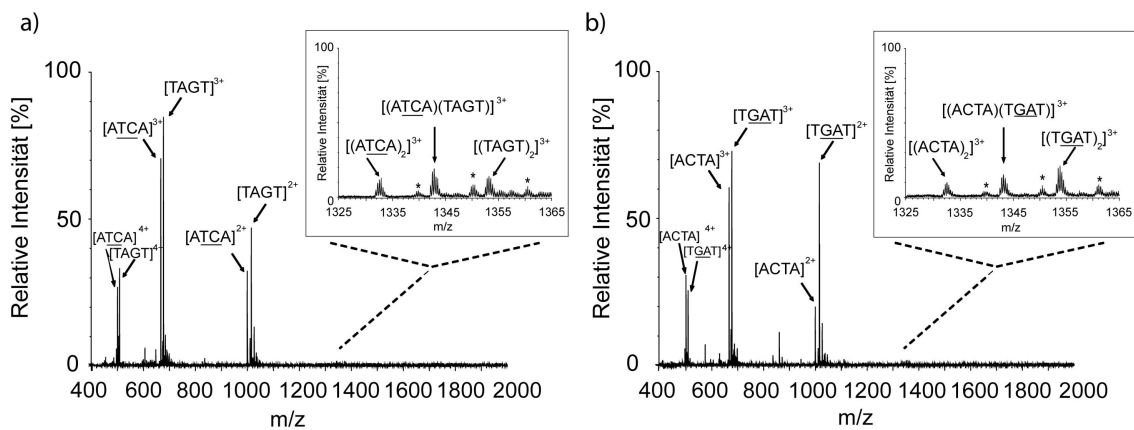


Abb. 31: Mögliche Kombinationen für die Ausbildung von Hetero-Dimeren unter Berücksichtigung einer parallelen oder antiparallelen Orientierung der beiden Helixstränge.

In Abb. 31 sind die Kombinationen herausgegriffen, welche entweder über eine parallele oder eine antiparallele Orientierung vollständig komplementäre Basenpaarungen erreichen. Bei der Oligomerisierung von ACTA mit TGAT führt eine parallele Strang-Orientierung zu einer komplementären Basenpaarung. Gleiches gilt für die Oligomerisierung von ATCA mit TAGT. Ist die parallele Orientierung der Stränge die bevorzugte Orientierung, dann sollten für eine äquimolare Mischung dieser Peptide Hetero-Oligomere gebildet werden, welche massenspektrometrisch untersucht werden können. Ist jedoch die antiparallele Orientierung der Helices günstiger, so sollten sich bevorzugt [(ACTA)(TAGT)]- und [(ATCA)(TGAT)]-Heterodimere ausbilden.

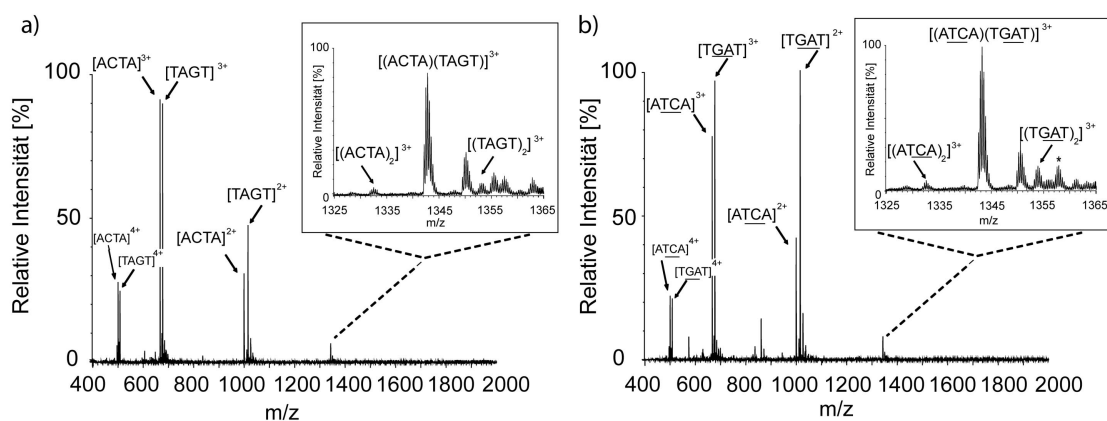
Für die Charakterisierung der bevorzugten Strang-Orientierung wurden demzufolge vier äquimolare Mischungen der PNAs hergestellt und massenspektrometrisch vermessen. Der Abb. 32 sind die MS-Spektren der Mischungen zu entnehmen, welche über eine parallele Orientierung der Helices eine höhere Anzahl an komplementären Wasserstoffbrücken ausbilden können.

Für jedes Peptid wurden Monomere in verschiedenen Ladungszuständen (2+ bis 4+) nahezu im Verhältnis 1:1 detektiert. Die 2-fach geladenen Monomere wichen in ihrer Intensität am stärksten voneinander ab. Für die nachfolgende, quantitative Auswertung des Oligomeranteils wurde deshalb die Intensität der Dimere relativ zu der Intensität der 3-fach geladenen Monomere ausgelesen. Im Oligomerbereich zwischen  $m/z$  1'325-1'365 waren bei paralleler Orientierung in geringen Mengen sowohl Homo- als auch Hetero-Dimere detektierbar. Ein signifikanter Unterschied im Dimeranteil konnte weder zwischen den verschiedenen Hetero-Dimeren noch zwischen Homo- und Hetero-Dimeren erkannt werden.



**Abb. 32:** MS-Spektren ( $m/z$  400-2'000, 100% = 14'200) einer 1:1-Mischung von a) ATCA und TAGT und b) ACTA und TGAT. Durch die parallele Zusammenlagerung der beiden Helixstränge kann eine vollständig komplementäre Basenpaarung erreicht werden. Die Detaildarstellung der MS-Spektren entspricht dem Dimerbereich der Peptide ( $m/z$  1'325-1'365, 100% = 1'110). In beiden Fällen sind Homo- und Hetero-Oligomere gleich stark ausgebildet, was auf eine schlechte Oligomerisierung schließen lässt.

Zur Untersuchung des Oligomerisierungsanteils bei antiparalleler Strang-Orientierung wurden äquimolare Mischungen von TGAT mit ATCA und TAGT mit ACTA hergestellt und massenspektrometrisch untersucht (Abb. 33). Im Monomerbereich der MS-Spektren wurden im Vergleich zu den vorherigen Spektren keine wesentlichen Veränderungen detektiert. Es zeigte sich jedoch, dass bei einer antiparallelen Orientierung ein signifikant höherer Anteil an Hetero-Dimer gebildet wird als bei einer parallelen Strang-Orientierung. Neben den Hetero-Dimeren ließen sich wiederum Homo-Dimere für beide Peptide detektieren. Ihre Intensität war gegenüber der Hetero-Dimer-Intensität vergleichsweise gering.

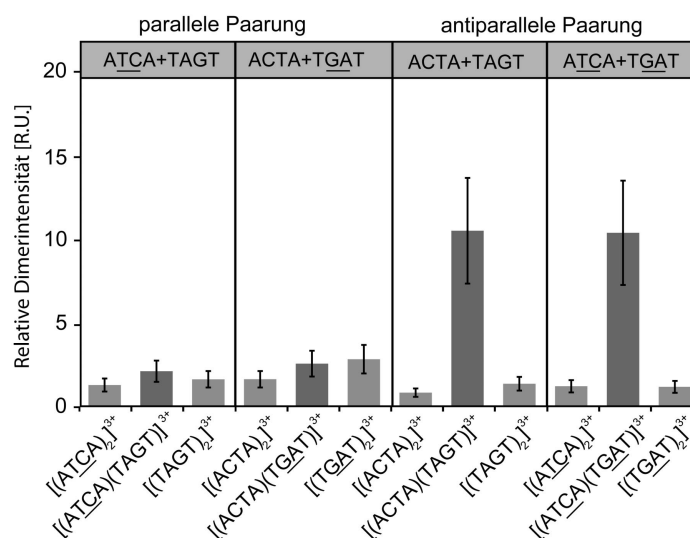


**Abb. 33:** MS-Spektren ( $m/z$  400-2'000, 100% = 14'200) einer 1:1-Mischung von a) ACTA und TAGT und b) ATCA und TGAT. Die komplementäre Basenpaarung wird über eine antiparallele Strang-Orientierung erreicht. Die Detaildarstellung der MS-Spektren entspricht dem Dimerbereich der Peptide ( $m/z$  1'325-1'365, 100% = 1'110). In beiden Fällen ist neben einer geringen Menge an Homo-Oligomeren ein hoher Anteil an Hetero-Dimer entstanden.

Für quantitative Aussagen wurden 3-5 unabhängige Messungen durchgeführt, deren mittlere Oligomeranteile in Abb. 34 dargestellt wurden. Die auf eine antiparallele Orientierung der Stränge zurückgehenden Oligomere waren mit einem Dimeranteil von 10 signifikant stärker ausgeprägt als die Oligomere, welche über eine parallele Strang-Orientierung ausgebildet wurden. Ihr Anteil lag bei 3.

Die detektierbaren Homo-Dimere lagen mit ihrem Dimeranteil ebenfalls bei etwa 3. Die Homo-Dimere konnten weder über eine parallele noch über eine antiparallele Orientierung der Einzelstränge eine Stabilisierung über Watson-Crick-Basenpaarungen erlangen. Ihre Existenz muss daher entweder auf unspezifische Wechselwirkungen oder auf andere, nicht-kanonische Interaktionen zurückzuführen sein.

Der signifikant höhere Dimeranteil der Hetero-Dimere bei antiparalleler Strang-Orientierung kann auf eine spezifische, kanonische Interaktion zweier PNAs zurückgeführt werden. Als bevorzugte Strang-Orientierung konnte daher die antiparallele Orientierung zweier Peptidnukleinsäure-Stränge ermittelt werden.



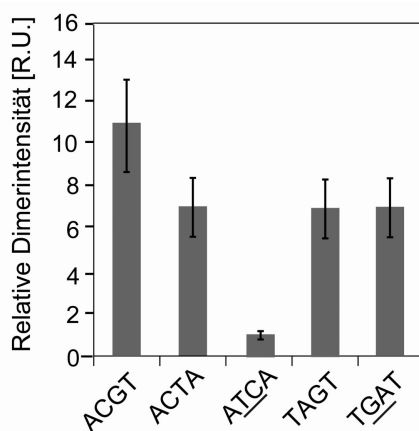
**Abb. 34: Quantitative Auswertung des Oligomeranteils bei paralleler und antiparalleler Paarung.** Obwohl die Nucleobasensequenz der ausgewählten PNAs keine Selbstaggregation erlaubte, können Homo-Dimere zu geringen Anteilen (3%) detektiert werden. Ähnlich verhält es sich mit den Hetero-Dimeren, welche sich über eine parallele Orientierung der Helixstränge komplementär zusammenlagern. Signifikante Unterschiede sind bei der antiparallelen Strang-Orientierung zu beobachten, weshalb diese als die bevorzugte Orientierung der Stränge angenommen wird. Der dargestellte Dimeranteil ist auf die jeweilige Intensität des 3-fach geladenen Monomers (= 100%) von TAGT bzw. TGAT bezogen.

#### 4.3.2.4 Sequenzspezifische Homo-Oligomerisierung

Die Bestimmung der bevorzugten Strang-Orientierung der interagierenden PNA-Helices ermöglichte im Folgenden die Untersuchung der sequenzabhängigen Selektivität der Peptidnukleinsäuren. Durch Variation der eingebauten Nucleinbasen werden die PNAs über

unterschiedlich viele Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Helices stabilisiert. Insgesamt sind vier Paarungsmodi möglich, auf welche bereits im einleitenden Teil dieser Arbeit eingegangen wurde (siehe Kapitel 1.1.3.2). Die wichtigsten sind die Watson-Crick-Basenpaarungen, welche dafür verantwortlich sind, dass sich zwischen Adenin und Thymin zwei und zwischen Cytosin und Guanin drei Wasserstoffbrücken ausbilden.

Für die in dieser Arbeit zur Verfügung stehenden Peptidnukleinsäuren war lediglich das ACGT-Peptid zur Ausbildung einer vollständig komplementären Basenpaarung befähigt. Alle anderen erreichten weder in einer parallelen noch in einer antiparallelen Orientierung eine vollständig kanonische Basenpaarung. Die Homo-Oligomeranteile der Peptide sind in Abb. 35 dargestellt. Das ACGT-Homo-Dimer, welches über insgesamt 10 Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden kann, wies mit einem Wert von 11 den höchsten Dimeranteil auf. Die Dimerisierung von ACTA, TAGT und TGAT war mit einem Wert von 7 ebenfalls sehr hoch. Eine komplementäre Basenpaarung ist für den hohen Oligomeranteil dieser Peptide allerdings nicht verantwortlich. Daher müssen andere Wechselwirkungen bei der Ausbildung und Stabilisierung dieser Homo-Dimere beteiligt sein. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, identifizierten Diederichsen *et al.* weitere spezifische Wechselwirkungen zwischen Peptidnukleinsäuren – diese könnten für die Ausbildung der Homo-Dimere verantwortlich sein.



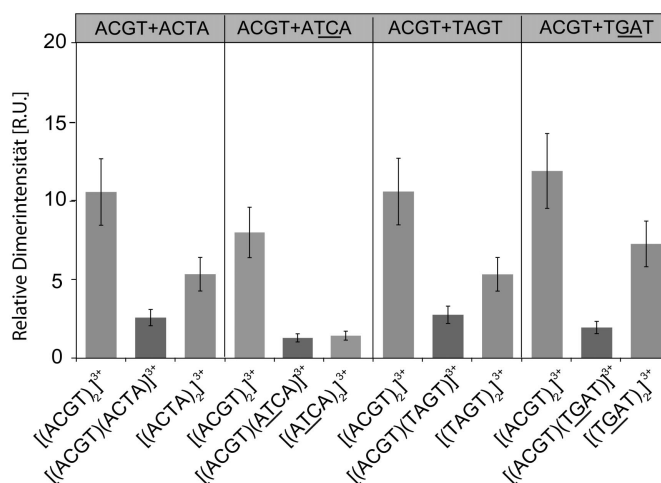
**Abb. 35: Homo-Dimeranteile der PNA Mutanten.** ACGT besitzt den höchsten Dimeranteil, was sich durch die Fähigkeit der vollständig komplementären Basenpaarung erklären lässt.

Das zu ACTA spiegelbildlich aufgebaute ATCA wies mit einem Dimeranteil von 3 die geringste Oligomerisierung der untersuchten Homo-Dimere auf. Beide Peptid-Dimere müssten bei einer antiparallelen Strang-Orientierung die gleichen Wechselwirkungen ausbilden, weshalb ein Unterschied im Oligomerisierungsverhalten beider Peptide nicht allein durch die sich ausbildenden Interaktionen erklärt werden kann. Hier müssen andere Zusammenlagerungen der Helices sowie andere Interaktionen berücksichtigt werden. Eine Erklärung hierfür wird zu einem späteren Zeitpunkt (siehe Kapitel 5.1.2) diskutiert.



#### 4.3.2.5 Sequenzspezifische Hetero-Oligomerisierung der Peptidnukleinsäuren

Das ACGT-Peptid zeigte in der Homo-Oligomerisierungsstudie den höchsten Dimeranteil. Dieser hohe Anteil wurde auf die Ausbildung komplementärer Basenpaarungen zurückgeführt, wozu dieses Peptid als einziges in der Lage war. Hohe Dimeranteile ließen sich auch für die Peptide ACTA, TAGT und TGAT detektieren. Dieses Oligomerisierungsverhalten konnte nicht über die Ausbildung komplementärer Watson-Crick-Basenpaarungen erklärt werden. Aufgrund der linearen Topologie der PNAs ist es möglich, dass auch andere Wechselwirkungen wie Hoogsteen-Basenpaarung sowie die reverse-Hoogsteen- und reverse-Watson-Crick-Basenpaarung die Oligomere stabilisieren (siehe Kapitel 1.1.3.2.). Um herauszufinden, ob diese Wechselwirkungen in der Lage sind, das über Watson-Crick-Basenpaarung stabilisierte ACGT-Homo-Dimer zu beeinträchtigen, wurden Hetero-Oligomerisierungsstudien durchgeführt. Als Basispeptid, mit welchem eine zweite Peptidnukleinsäure im 1:1-Verhältnis gemischt wurde, fungierte das ACGT. Die detektierbaren Homo- und Hetero-Dimeranteile sind der Abb. 36 zu entnehmen.



**Abb. 36: Homo- und Hetero-Dimeranteile einer 1:1-Mischung von ACGT und einer weiteren Peptidnukleinsäure.** Das über komplementäre Basenpaarung stabilisierte ACGT-Homo-Dimer wird nicht zugunsten anderer, nichtkomplementärer Wechselwirkungen aufgegeben, weshalb die Hetero-Dimerisierung nur marginal ist. Die dargestellten Dimeranteile beziehen sich jeweils auf die detektierten ACGT-Monomerintensitäten.

Die sich ausbildenden Hetero-Dimere wurden teilweise über Watson-Crick-Basenpaarungen stabilisiert – eine vollständig komplementäre Basenpaarung wurde jedoch nicht erreicht. Die Hetero-Dimere [(ACGT)(ACTA)]<sup>3+</sup> und [(ACGT)(TAGT)]<sup>3+</sup> wurden über 5 Wasserstoffbrücken stabilisiert, die Hetero-Dimere [(ACGT)(ATCA)]<sup>3+</sup> und [(ACGT)(TGAT)]<sup>3+</sup> aufgrund einer einzigen A-T-Bindung über maximal 2 Wasserstoffbrücken. Trotz dieser Unterschiede konnten keine signifikanten Differenzen in den Anteilen der Hetero-Dimere beobachtet werden. Der maximale Hetero-Dimeranteil hatte einen Wert von 3.

Betrachtet man die Homo-Dimeranteile der Peptid-Mischung, so zeigt sich, dass dem ACGT-Dimer in allen Mischungen der höchste Dimeranteil zukommt. Dieses Peptid ist, wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt wurde, das einzige Peptid, welches über eine vollständig komplementäre Basenpaarung stabilisiert werden kann. Anhand der Hetero-Dimeranteile wurde ersichtlich, dass sich diese Interaktionen nicht zugunsten anderer Wechselwirkungen beeinflussen ließen. Die Watson-Crick-Basenpaarung geht somit als die bevorzugte Basenpaarung der Peptidnukleinsäuren hervor. Neben diesen könnten die PNA-Oligomere auch über andere Paarungsmodi stabilisiert werden, worauf in Kapitel 5.1.2 genauer eingegangen wird.

### 4.3.3 Cytochrom $b'_{559}$ -Peptid

Die Oligomerisierung der Peptidnukleinsäuren sowie der VSV-Peptide lief selbständig und ohne den Einfluss eines Cofaktors ab. Das Cytochrom  $b_{559}$  ähnliche Protein kann ebenfalls, wie aus *in vivo* Messungen bekannt ist, Oligomere ausbilden. Im Nachfolgenden wurde der Einfluss von Häm als Cofaktor auf die Homo-Oligomerisierung der Cytochrom b-Peptide untersucht. Des Weiteren sollte die Hämbindestelle unter Verwendung verschiedener Cytochrom  $b'_{559}$ -Mutanten genauer analysiert werden.

#### 4.3.3.1 Design des Cytochrom $b'_{559}$ -Proteins

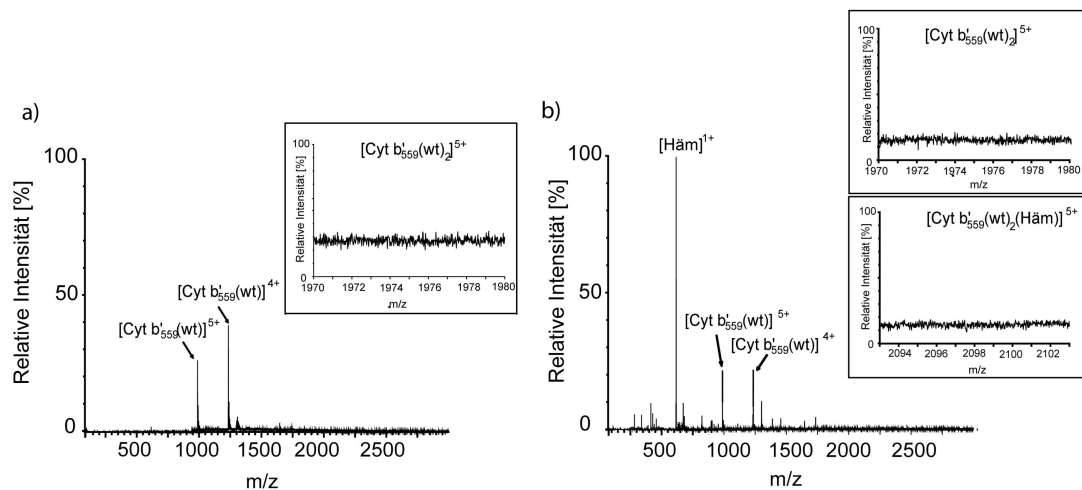
Aus bakteriellen Systemen (Cyanobakterien) ist bekannt, dass der Cytochrom  $b_{559}$ -Komplex aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit besteht, welche über eine zentrale Hämgruppe miteinander verbunden sind [46, 96]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Cytochrom  $b_{559}$  ähnliches Protein, das Cytochrom  $b'_{559}$  analysiert. Synthetisiert wurde es in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Schneider (Universität Freiburg). Das Protein besteht aus 44 Aminosäuren der  $\beta$ -Domäne (PsbF) und es ist als  $\alpha$ -helikales, membrandurchspannendes Protein in der Lage ist, *in vitro* durch die Zugabe von Häm Homo-Dimere auszubilden. Diese lassen eine dem Cytochrom  $b_{559}$  ähnliche Struktur vermuten [48, 97]. Die Aminosäuresequenz des Cytochrom  $b'_{559}$ -Wildtyps ist der Tabelle 7 zu entnehmen. Um die Protein-Hämbindung detaillierter untersuchen zu können, wurde eine Mutante synthetisiert, in welcher das Arginin in Position 18 durch ein Alanin ersetzt wurde (Cyt  $b'_{559}$  R18A).

**Tabelle 7: Aminosäuresequenzen der verwendeten Cytochrom  $b'_{559}$ -PsbF-Peptide.**

Peptid	
Cyt b wt	MATQNPNPVTYPIFTVRWLAVHTLAVPSVFFVGAIAAMQFIQR
Cyt b R18A	MATQNPNPVTYPIFTVAWLAVHTLAVPSVFFVGAIAAMQFIQR

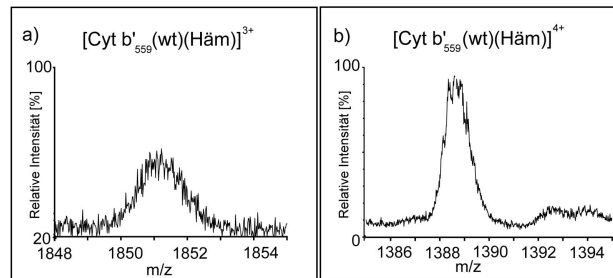
#### 4.3.3.2 Einfluss des Häm-Cofaktors auf die Oligomerisierung

Der Einfluss des Cofaktors auf die Oligomerisierung des Cytochrom  $b'_{559}$ -Peptides konnte anhand eines Vergleichs zwischen einer  $\text{Cyt } b'_{559}$ -Lösung mit und ohne Häm analysiert werden. Als hydrophobes Transmembranprotein weist Cytochrom  $b'_{559}$  eine schlechte Wasserlöslichkeit auf, weshalb als Lösemittel Trifluoethanol Verwendung fand, wie es auch schon bei den VSV-Peptiden zum Einsatz kam. Das Massenspektrum einer  $12,5 \mu\text{M}$   $\text{Cyt } b'_{559}$ -Lösung in 80% TFE, versetzt mit 4 mM Ammoniumacetat (pH 7,4), zeigte im Wesentlichen 4- und 5-fach geladenes, monomeres  $\text{Cyt } b'_{559}$  (Abb. 37 a). Zu einem geringeren Anteil konnte auch 3-fach geladenes Monomer detektiert werden. Aufgrund des begrenzten Messbereichs des Gerätes konnte das Dimer mit einer Masse von  $9'723,4 \text{ Da}$  nicht in den Ladungszuständen  $1+$  bis  $4+$  detektiert werden. Der kleinst mögliche Ladungszustand, welcher mit dem verwendeten Q-TOF Massenspektrometer theoretisch detektiert werden kann, ist das 5-fach geladene Dimer bei einem  $m/z$ -Wert von  $1'945,7$ . Wie man an dem in Abb. 37 a vergrößerten Dimerbereich erkennen kann, wurden keine 5-fach geladenen Homo-Dimere gebildet. Auch die Ausbildung höher geladener Oligomere konnte nicht beobachtet werden.



**Abb. 37:** MS-Spektren ( $m/z$ -Bereich  $100\text{-}3'000$ ,  $100\% = 20'600$ ) einer Cytochrom  $b'_{559}$ -Lösung in einer 80%igen TFE-Lösung mit 2 mM Ammoniumacetat pH 7,4. a) MS-Spektrum ohne die Zugabe von Hämatin. b) MS-Spektrum nach der Zugabe von  $3 \mu\text{M}$  Hämatin in 100% TFE. Die Spektren zeigen, dass eine Oligomerisierung des Peptids nicht durch den Einsatz des Cofaktors hervorgerufen werden kann.

Die Zugabe von  $3 \mu\text{M}$  Hämatin (gelöst in 100% TFE) löste die Detektion zusätzlicher Signale aus (Abb. 37 b). Das im Spektrum dominierende Signal bei einem  $m/z$ -Wert von  $617,3$  konnte einer 1-fach geladenen Hämgruppe zugeordnet werden. Die Signale für monomeres  $\text{Cyt } b'_{559}$  bei den  $m/z$ -Werten  $1'234,5$  und  $987,8$  blieben auch nach der Zugabe von Häm in vergleichbarer Intensität erhalten. Unterschiede im Homo-Dimerbereich ( $m/z$   $1'970\text{-}1'980$ ) waren im Vergleich zu der Messung ohne Hämatin nicht zu detektieren. Auch ein 2:1 Peptid-Cofaktor-Komplex wurde nicht gebildet. Stattdessen lagerte sich die Hämgruppe an monomeres Cytochrom  $b'_{559}$  an, was durch die Signale bei  $1'851,8$  und  $1'388,6$  beobachtet werden konnte (Abb. 38).

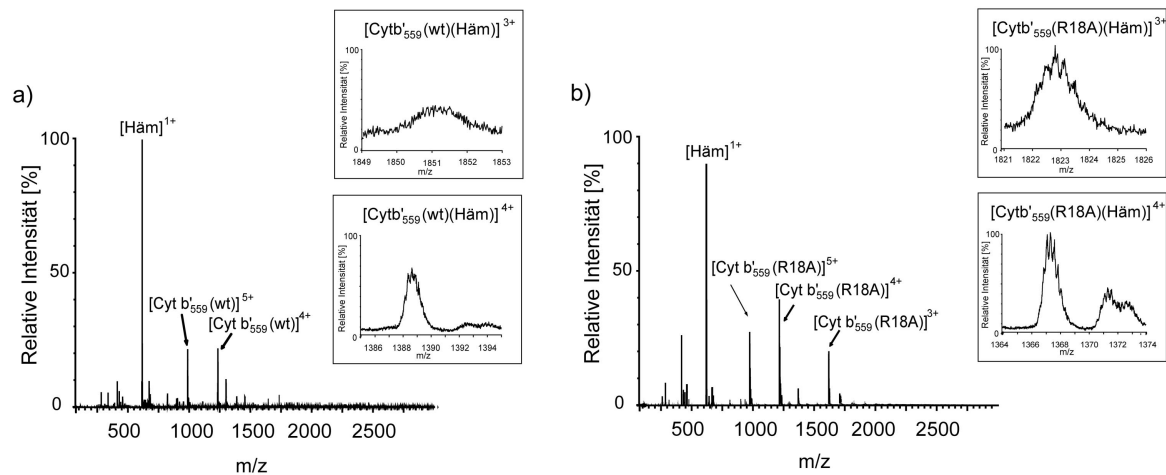


**Abb. 38: Detaildarstellung der Cytochrom b'<sub>559</sub>-Hämatin-Komplexbereiche.** a) Das Signal bei m/z 1'851,8 entspricht dem 3-fach geladenen 1:1-Komplex. b) Das Signal bei m/z 1'388,6 entspricht dem 4-fach geladenen 1:1-Komplex.

Aufgrund der fehlenden Peptid-Oligomere konnte gezeigt werden, dass die Oligomerisierung der Peptide in Lösung nicht durch die Zugabe des Hämatins beeinflusst wird. Da die Hämbindung, wie aus der Röntgenstrukturanalyse bekannt ist, über das Histidin in Position 23 ausgebildet wird, kann die Anlagerung der Hämgruppe auch an ein Peptid-Monomer erfolgen [98]. Arginin in Position 18 käme ebenfalls für eine Interaktion mit der Hämgruppe in Frage. Beide Wechselwirkungen ermöglichen somit die Ausbildung des Peptid-Häm-Komplexes, ohne eine Oligomerisierung zweier Cytochrom b'<sub>559</sub>-Peptide hervorzurufen.

#### 4.3.3.3 Sequenzabhängige Bindung des Cofaktors

Die Bindung der Hämgruppe an das Cytochrom b'<sub>559</sub>-Wildtyp-Peptid wurde im vorangegangenen Kapitel eindeutig belegt. Welche Aminosäure der Peptidsequenz einen Beitrag zur Komplexbildung liefert, sollte durch die Verwendung einer Mutante untersucht werden. Strukturbestimmungen zeigen die Interaktion zwischen der Hämgruppe und dem His-23 auf, wobei auch Arg-18 an der Hämbindung beteiligt sein könnte [98]. Prodöhl *et al.* konnten eine Beeinträchtigung der Hämbindung für die R18A-Mutante zeigen [49]. Ein Vergleich der massenspektrometrisch detektierbaren 1:1-Peptid-Häm-Komplexe der beiden Cytochrom b'<sub>559</sub>-Peptide ist in Abb. 39 dargestellt. In beiden Spektren waren neben dem 1-fach geladenen Hämatin auch Cytochrom b'<sub>559</sub>-Monomere in den Ladungszuständen 3+ bis 5+ detektierbar.



**Abb. 39: MS-Spektren ( $m/z$  100-3'000, 100% = 21'000) der Cytochrom  $b'_{559}$ -Mutanten nach der Zugabe von Häm. a) Cytochrom  $b'_{559}$  wt. b) Cytochrom  $b'_{559}$  R18A.**

Oligomere der Cytochrom b-Peptide waren, wie auch schon für die Wildtypsequenz beschrieben, auch nicht für die R18A-Mutante nachweisbar. Die Hämbindung erfolgte wiederum an monomeres Peptid. In den Detaildarstellungen der Abb. 39 ließen sich sowohl für den Wildtyp als auch für die Mutante Peptid-Häm-Komplexe detektieren. Da die Ausbildung des Peptid-Häm-Komplexes durch den Austausch des Arginins nicht beeinträchtigt wurde, wird die Häminteraktion in beiden Mutanten über das His-23 bewerkstelligt. Dennoch könnte das Arginin im Falle des Cyt  $b'_{559}$  wt einen Beitrag zur Stabilität des Peptid-Häm-Komplexes liefern, welcher in der R18A-Mutante nicht vorhanden sein dürfte. Aufschluss über diese Vermutung geben Stabilitätsmessungen, welche zu einem späteren Zeitpunkt (siehe Kapitel 5.1.4) genauer beschrieben werden.

#### 4.4 Charakterisierung von Protein-Ligand-Interaktionen

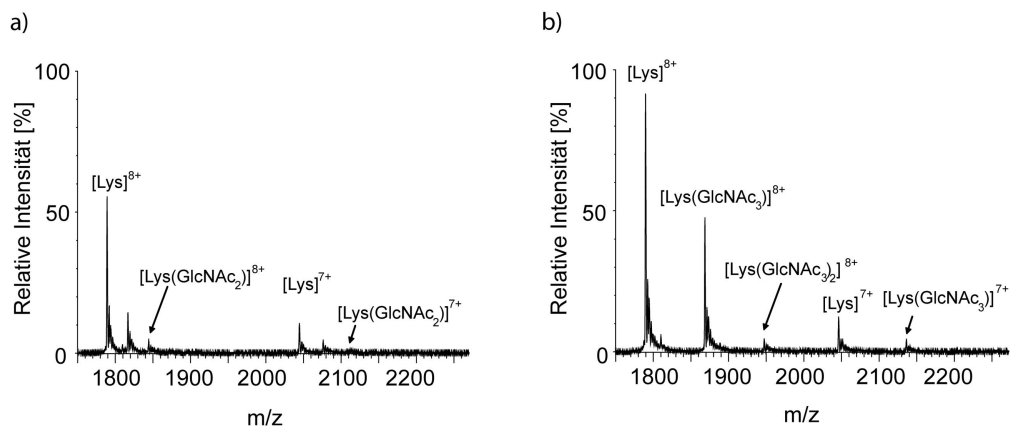
Während sich der erste Teil dieser Arbeit mit Peptid-Peptid- und Peptid-Ligand-Komplexen des niedermolekularen Bereichs bis zu 6'000 Da befasste, wird im Nachfolgenden der Fokus auf die Komplexbildung sowie Komplexdissoziation größerer Protein-Ligand-Komplexe gerichtet. Ähnlich wie bei der Charakterisierung der Peptid-Komplexe spielen auch bei den Protein-Ligand-Komplexen Konzentrationseinflüsse sowie die Einflüsse des Lösemittels eine wichtige Rolle. Durch die Verwendung verschiedener Ligandsysteme wurden neben spezifischen auch unspezifische Komplexe analysiert. Mit Hilfe von Affinitätsbestimmungen konnten diese Komplexe eingehend charakterisiert werden.

#### 4.4.1 Protein-Komplexe mit variablen Liganden

Funktionelle Proteine, die eine chemische Reaktion katalysieren, werden Enzyme genannt. Mit ihrem Substrat, das in der Regel im aktiven Zentrum des Proteins gebunden wird, bilden sie Protein-Ligand-Komplexe, welche hier näher charakterisiert werden. Da das Substrat in der hydrophoben Tasche des Enzyms gespalten wird, sind Enzym-Substrat-Komplexe meist sehr kurzlebig, weshalb zur Charakterisierung der Protein-Ligand-Wechselwirkungen besser Enzym-Inhibitor-Komplexe untersucht werden. Inhibitoren binden ebenfalls im aktiven Zentrum, werden vom Enzym allerdings nicht abgebaut und können daher genauer charakterisiert werden. Für das Enzym Lysozym sind verschiedene Inhibitoren bekannt. Sie binden kompetitiv im aktiven Zentrum des Proteins und blockieren so den Substratabbau. Sowohl das Substrat als auch die Inhibitoren sind aus Monosacchariden aufgebaut, welche sich in ihrer Kettenlänge unterscheiden. Wie sich die Kettenlänge der Liganden auf die Komplexbildung ausübt, wurde im Folgenden anhand von drei verschiedenen Liganden  $\text{GlcNAc}_n$  mit  $n = 1-3$  untersucht.

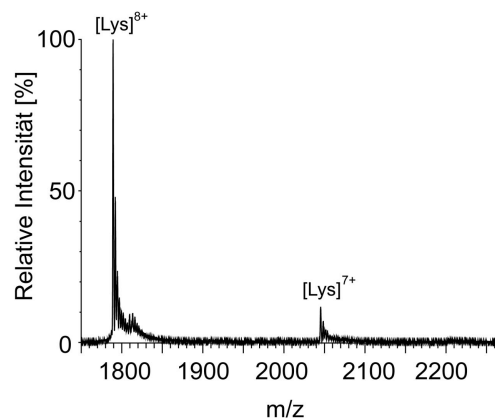
##### 4.4.1.1 Komplexbildung in Abhängigkeit der Oligomerlänge

Die massenspektrometrische Untersuchung der Protein-Ligand-Komplexbildung erfolgte mit einer  $5 \mu\text{M}$  Lysozymlösung, welcher  $10 \mu\text{M}$  eines der Oligosaccharide  $\text{GlcNAc}_n$  mit  $n = 1-3$  zugesetzt wurde. Als höchstes Signal konnte in allen Spektren, unabhängig von zugesetzten Liganden, 8-fach geladenes Lysozym beobachtet werden, weshalb im Nachfolgenden besonders auf die 8-fach geladenen Komplexe eingegangen wird. Einen Spektrenvergleich für die Mischungen mit  $\text{GlcNAc}_2$  und  $\text{GlcNAc}_3$  ist in Abb. 40 a und b dargestellt. Die Detektion eines 1:1-Protein-Ligand-Komplexes bestätigte, dass sich beide Liganden mit Lysozym komplexieren ließen. Dennoch war die Komplexbildung im Falle der N-Acetylchitotriose stärker ausgeprägt (Abb. 40 b). Des Weiteren ließ sich für  $\text{GlcNAc}_3$  neben dem 1:1-Komplex der 1:2-Protein-Ligand-Komplex beobachten. Für den kürzerkettigen  $\text{GlcNAc}_2$ -Liganden war dies unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht möglich. Die höhere Signalintensität des  $[\text{Lys}(\text{GlcNAc}_3)]$ -Komplexes wies bereits auf eine höhere Affinität der Chitotriose zum Lysozym hin. Die Bindung des Liganden an das aktive Zentrum erfolgt bei acetylierten Liganden über die Acetylgruppe [59]. Längerkettige Liganden wie das  $\text{GlcNAc}_3$  besitzen mehr Acetylgruppen als kürzerkettige Liganden und können daher mehrere Wechselwirkungen mit dem Enzym eingehen. Folglich binden diese Liganden mit einer höheren Affinität an das Lysozym, was anhand der Signalintensität der Komplexe nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 40: MS-Spektren (m/z 1'750-2'270, 100% = 4'530) einer 5  $\mu$ M Lysozymlösung, welche mit 10  $\mu$ M Ligand versetzt wurde.** a) Als Ligand wurde GlcNAc<sub>2</sub> verwendet. b) Als Ligand wurde GlcNAc<sub>3</sub> verwendet. Beim Vergleich beider Spektren wird deutlich, dass die Komplexbildung zwischen Lysozym und GlcNAc<sub>3</sub> intensiver verläuft als die zwischen Lysozym und GlcNAc<sub>2</sub>.

Der Monozucker GlcNAc besitzt lediglich eine Acetylgruppe, was sich in der Komplexierung des Liganden bemerkbar macht (Abb. 41). Obwohl der Ligand im unteren m/z-Bereich als 1-fach geladenes Monomer und Dimer detektiert werden konnte, erfolgte keine Komplexbildung mit dem Enzym. Die im dargestellten m/z-Bereich zu beobachtenden Signale ließen sich ungebundenen Lysozymmolekülen in verschiedenen Ladungszuständen zuordnen.



**Abb. 41: MS-Spektrum (m/z 1'750-2'270, 100% = 4'530) einer 5  $\mu$ M Lysozymlösung, versetzt mit 10  $\mu$ M GlcNAc.** Protein-Ligand-Komplexierungen können nicht beobachtet werden.

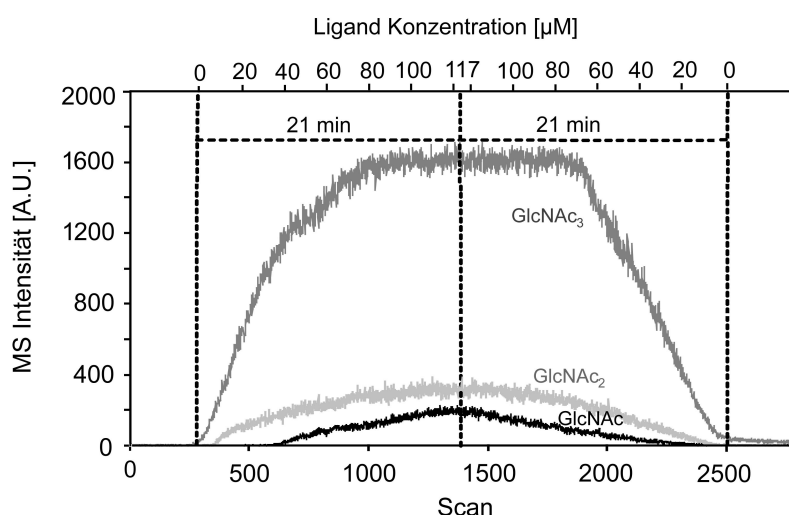
Die fehlende Komplexbildung zwischen dem Lysozym und dem Monosaccharid kann auf eine zu schwache Wechselwirkung zwischen der einzelnen Acetylgruppe des GlcNAc-Liganden und dem aktiven Zentrum des Lysozyms zurückgeführt werden.

Die Affinitätsabnahme mit abnehmender Kettenlänge wurde bereits über verschiedene Flüssig-Phasen-Untersuchungen wie Fluoreszenztitrationen und UV-Messungen mit anschließender Berechnung der Affinitätskonstanten untersucht [61, 99]. Die Massenspektrometrie bestätigte als Gas-Phasen-Detektionsmethode die Ergebnisse der Flüssig-Phasen-Untersuchungen. Wie sich Veränderungen der Flüssig-Phase zum Beispiel durch Erhöhung der Ligandkonzentration auf die massenspektrometrisch detektierte Komplexbildung auswirken, wurde mit Hilfe des kontinuierlichen Gradientensystems untersucht, worauf im Folgenden näher eingegangen wird.

#### 4.4.1.2 Komplexbildung in Abhängigkeit der Ligandkonzentration

Die konzentrationsabhängigen Messungen zur Charakterisierung der Protein-Ligand-Komplexbildung wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Tanja Köllmeier über ein kontinuierliches Gradientensystem (siehe Kapitel 3.4.4.3, Abb. 11 b) durchgeführt [100]. Dieser Versuchsaufbau ermöglichte durch den Einsatz der binären HPLC-Pumpe eine lückenlose und automatisierte Erfassung eines Konzentrationsgradienten. Da in dem hier durchgeführten Gradienten zunächst nur ein Ligand eingesetzt werden sollte, kam der in Abb. 11 b dargestellte Versuchsaufbau ohne die optional erweiterbare Spritzenpumpe zum Einsatz. In Superloop 3 befand sich eine 5  $\mu\text{M}$  Lysozymlösung, welche während der gesamten Mess- und Gradientenzeit kontinuierlich mit einer Flussrate von 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  gepumpt wurde. Ein in der Lysozymlösung enthaltener interner Standard (IS) zeigte später die Konstanz der isokratischen Pumpe an. Hierfür wurde Malantide (Konzentration 1  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt, eine Substanz, welche keine Komplexe mit den in der Lösung enthaltenen Substanzen ausbildet. Malantide wurde konstant gepumpt, weshalb sich dessen Signalintensität während der gesamten Messzeit nicht änderte. Andernfalls hätte dies auf eine mangelnde Konstanz der Pumpleistung zurückgeführt werden können. Die Gradientenpumpe, bestehend aus Pumpe A und B, war für die Variation der Ligandkonzentration verantwortlich. Diese wurde innerhalb von 21 Minuten von 0 auf 117  $\mu\text{M}$  gesteigert und nach zwei konstanten Minuten im gleichen Zeitfenster wieder auf 0  $\mu\text{M}$  abgesenkt. Die hierbei verwendeten Liganden ließen sich hauptsächlich als 1-fach geladene Monomere und Dimere detektieren. Veränderungen, die in den Ligandintensitäten aufgrund der Konzentrationserhöhung zu verzeichnen waren, sind in Abb. 42 für die drei unabhängigen Messungen der drei verwendeten Liganden dargestellt.

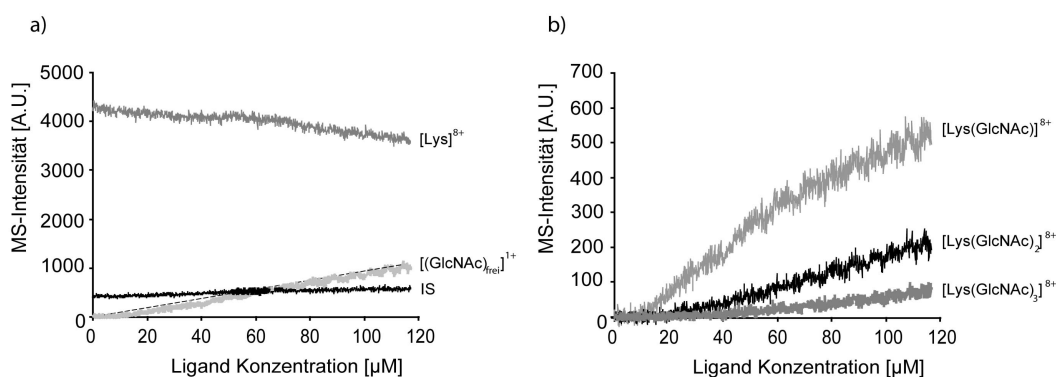




**Abb. 42: Chromatogramme (EICs) der Liganden (GlcNAc<sub>n</sub> mit n = 1-3), die den Verlauf der konzentrationsabhängigen Gradientenmessung wiedergeben.** Die Konzentration der Liganden wurde innerhalb von 21 Minuten von 0 auf 117 µM gesteigert und nach 2 Minuten wieder auf 0 µM abgesenkt. Unterschiedliche Signalintensitäten der 1-fach geladenen Liganden bei gleicher Konzentration lassen sich auf eine unterschiedliche Ionisierung der Liganden zurückführen.

Da der Konzentrationsgradient (Abb. 42) sowohl Zu- als auch Abnahme der Ligandkonzentration gleichermaßen beinhaltete und die EICs einen sehr symmetrischen Verlauf widerspiegeln, wurde im Folgenden ausschließlich auf die Konzentrationszunahme eingegangen.

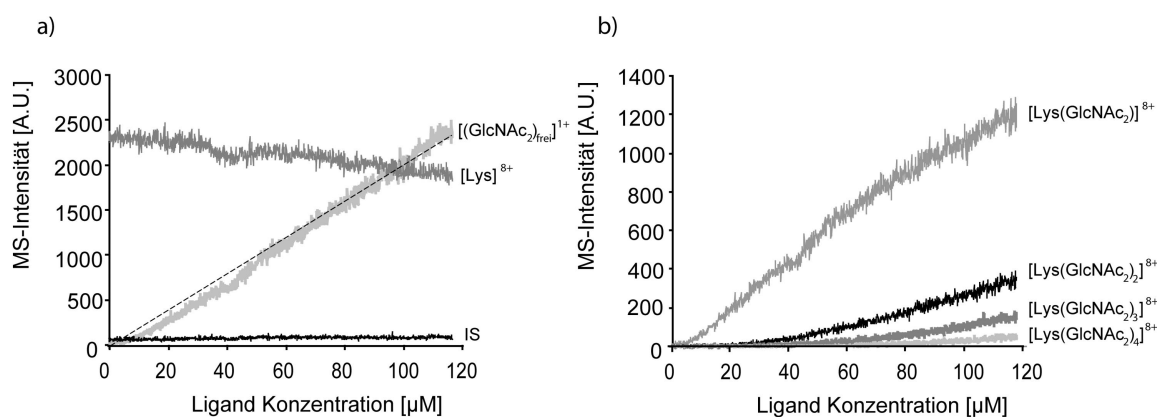
Die Einflüsse der GlcNAc-Konzentration auf die Komplexbildung sind in Abb. 43 a und b dargestellt. Der kontinuierliche Anstieg der Ligandkonzentration ist durch eine gestrichelte Linie dargestellt, welche sich mit der Signalintensität des (GlcNAc)<sub>frei</sub> deckt. Weiterhin konnten aufgrund des konstanten Intensitätsverlaufs des internen Standards (IS) Systemschwankungen ausgeschlossen werden.



**Abb. 43: Chromatogramme (EICs) verschiedener Signale aus einer GlcNAc-Gradientenmessung mit 5 µM Lysozym.** a) Interner Standard (IS), freies 8-fach geladenes Lysozym [Lys]<sup>8+</sup> und die Summe aus 1-fach geladenem Ligand-Monomer (GlcNAc)<sub>frei</sub>. b) Entstandene Komplexe [Lys(GlcNAc)<sub>x</sub>] mit x = 1-3.

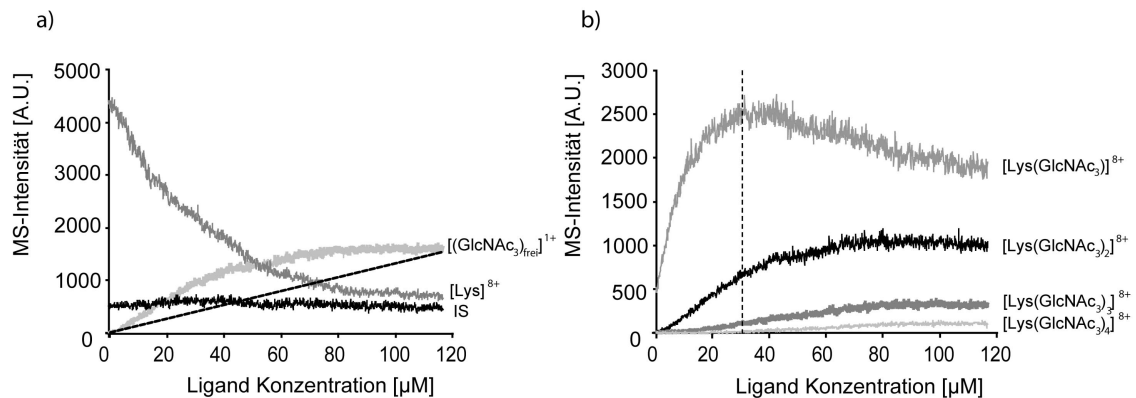
Eine Komplexbildung zwischen Ligand und freiem Lysozym müsste die Signalintensität des freien Lysozyms verringern. Zu Beginn des Gradienten konnte nur eine marginale Abnahme der Lysozymsignalintensität beobachtet werden, weshalb nur geringe Mengen an Protein-Ligand-Komplexen gebildet wurden. Ihre Chromatogramme sind in Abb. 43 b dargestellt. Eine Komplexbildung setzte erst ab einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  Ligand ein. Dies zeigte, dass die im vorangegangenen Kapitel eingesetzte Ligandkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  für eine nachweisbare Komplexbildung zu gering war (vgl. Abb. 41). Der Anteil des 1:1-Protein-Ligand-Komplexes wurde durch die Steigerung der GlcNAc-Konzentration weiter ausgebaut, wobei höhere Ligandkonzentrationen auch die Bildung höherer Komplexe auslösten. Die Signalintensitäten aller detektierbaren Komplexe nahmen über den gesamten Konzentrationsbereich proportional mit der GlcNAc-Konzentration zu.

Ähnlich verhielt es sich beim Konzentrationsgradienten des  $\text{GlcNAc}_2$  (Abb. 44). Eine geringe Abnahme der Signalintensität des 8-fach geladenen Lysozyms erklärte wiederum die Komplexbildung des freien Lysozyms. Die Bildung des 1:1-Komplexes setzte bereits bei einer geringeren Ligandkonzentration ein. Auch höhere Komplexe bildeten sich ähnlich wie beim N-Acetylglucosamin erst bei einer Zugabe von 40  $\mu\text{M}$  Ligand (Abb. 44 b). Im untersuchten Konzentrationsbereich (0-117  $\mu\text{M}$ ) konnten insgesamt vier Disaccharide an Lysozym binden. Wie schon bei GlcNAc beobachtet wurde, stiegen die Signalintensitäten der gebildeten Komplexe konstant mit zunehmender Ligandkonzentration an.



**Abb. 44: Chromatogramme (EICs) verschiedener Signale aus einer  $\text{GlcNAc}_2$ -Gradientenmessung mit 5  $\mu\text{M}$  Lysozym.** a) Interner Standard (IS), freies 8-fach geladenes Lysozym  $[\text{Lys}]^{8+}$  und die Summe aus 1-fach geladenem Ligand-Monomer  $(\text{GlcNAc}_2)_{\text{frei}}$ . b) Entstandene Komplexe  $[\text{Lys}(\text{GlcNAc}_2)_x]^{8+}$  mit  $x = 1-4$ .

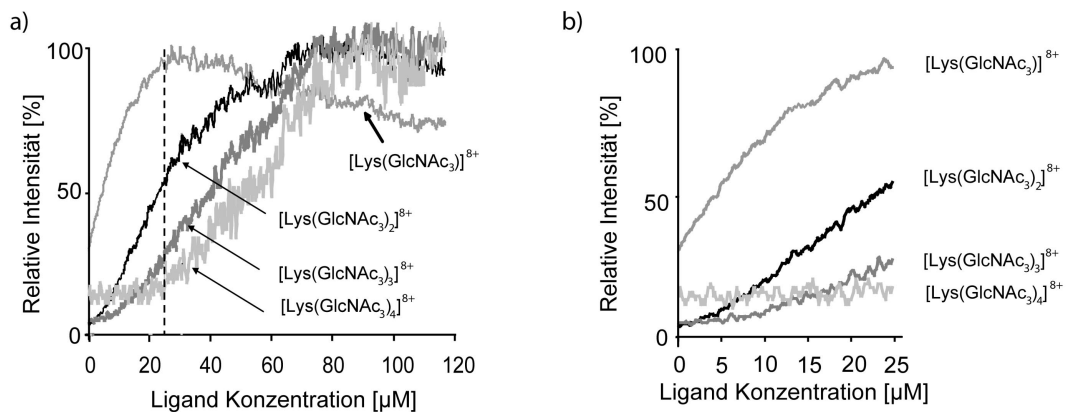
Anders verhielt es sich bei der Zugabe von  $\text{GlcNAc}_3$  (Abb. 45). Schon zu Beginn des Konzentrationsgradienten nahm die Intensität des freien, in der Lösung enthaltenen Lysozyms rapide ab und verlor während der gesamten Messzeit etwa 70% seiner ursprünglichen Signalintensität.



**Abb. 45: Chromatogramme (EICs) verschiedener Signale aus einer GlcNAc<sub>3</sub>-Gradientenmessung mit 5 µM Lysozym.** a) Interner Standard (IS), freies 8-fach geladenes Lysozym  $[\text{Lys}]^{8+}$  und die Summe aus 1-fach geladenem Ligand-Monomer  $(\text{GlcNAc}_3)_{\text{frei}}$ . b) Entstandene Komplexe  $[\text{Lys}(\text{GlcNAc}_3)_x]^{8+}$  mit  $x = 1-4$ .

Auch die Intensität des freien  $\text{GlcNAc}_3$  spiegelt in dieser Messung nicht die kontinuierlich ansteigende Ligandkonzentration (gestrichelte Linie) wider (Abb. 45 a). Bei genauerer Betrachtung fiel auf, dass der Anstieg gegenüber dem theoretischen Verlauf steiler, jedoch bis zu einer Konzentration von etwa 50 µM konstant verlief. Bei weiterer Zugabe von Ligand erreichte die Signalintensität bei einer Ligandkonzentration von 65 µM ein Plateau.

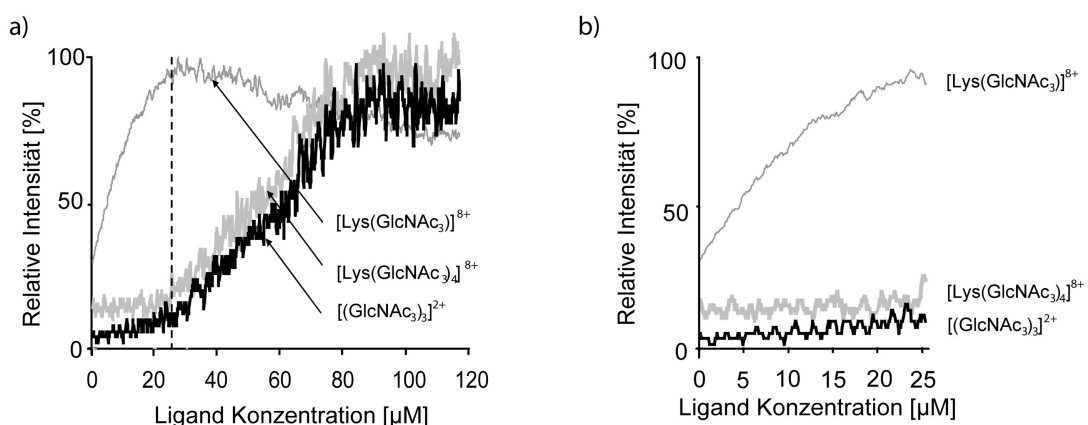
Den EICs der Protein-Ligand-Komplexe konnte außerdem entnommen werden, dass auch die Signalintensität des 1:1-Komplexes nicht kontinuierlich mit zunehmender Ligandkonzentration anstieg, sondern bei etwa 30 µM Ligand ein Maximum erreichte (Abb. 45 b). Im weiteren Verlauf nahm die Intensität des 1:1-Komplexes wieder ab. Auffällig war weiterhin, dass sich der höhere 1:2-Protein-Ligand-Komplex bereits bei sehr geringen Ligandkonzentrationen ausbildete. Seine Signalintensität flachte ebenfalls bei höheren Konzentrationen (65 µM) ab, erfuhr aber keinen Einbruch. Obwohl Lysozym in der Bindungstasche lediglich über sechs Bindungsstellen verfügt, welche mit maximal zwei  $\text{GlcNAc}_3$ -Molekülen besetzt werden können, bildeten sich auch 1:3- und 1:4-Komplexe. Ihre Detektion erfolgte ab einer Ligandkonzentration von 25 µM – simultan mit dem Abflachen und dem nachfolgenden Einbruch der  $[\text{Lys}(\text{GlcNAc}_3)]^{8+}$ -Intensität. Die Ausbildung der höheren Oligomere scheint Einfluss auf die Detektion des 1:1-Komplexes zu haben. Dies konnte durch eine andere Auftragung besser zur Geltung gebracht werden. Hierfür wurden die maximalen Intensitäten der Komplexe jeweils auf 100% gesetzt und ihr Verlauf während der Zunahme der Ligandkonzentration aufgezeigt (Abb. 46 a). In Abb. 46 b wurde der Konzentrationsbereich bis 25 µM fokussiert. In diesem Bereich stieg die Signalintensität des 1:1-Komplexes noch proportional mit zunehmender  $\text{GlcNAc}_3$ -Konzentration an.



**Abb. 46: Chromatogramme der detektierbaren Komplexe aus Lysozym und GlcNAc<sub>3</sub>, normiert auf 100% ihrer Maximalintensität.** a) Gesamter Konzentrationsbereich der Gradientenmessung von 0 bis 117 µM Ligand. b) Unterer Konzentrationsbereich der Gradientenmessung bis 25 µM Ligand.

Die höheren Oligomere, besonders der 1:4-Komplex, waren in diesem Konzentrationsbereich noch nicht bzw. kaum vorhanden. Sie wurden erst über einer Konzentration von 25 µM gebildet – simultan mit dem Intensitätseinbruch des 1:1-Komplexes. Die Ausbildung höherer Komplexe erklärte sich dadurch, dass sowohl der 1:3- als auch der 1:4-Protein-Ligand-Komplex aus dem 1:1-Komplex gebildet wurden. Die Anlagerung der Liganden erfolgte auf der Proteinoberfläche, da die hydrophobe Tasche des 1:1-Komplexes bereits mit einem Liganden besetzt war.

Ein weiteres Signal, welches erst ab einer Konzentration von 25 µM entstand und einen mit den höheren Komplexen [Lys(GlcNAc<sub>3</sub>)<sub>x</sub>] (mit x = 3 und 4) identischen Kurvenverlauf aufwies, ist das Trimer des Liganden (Abb. 47).



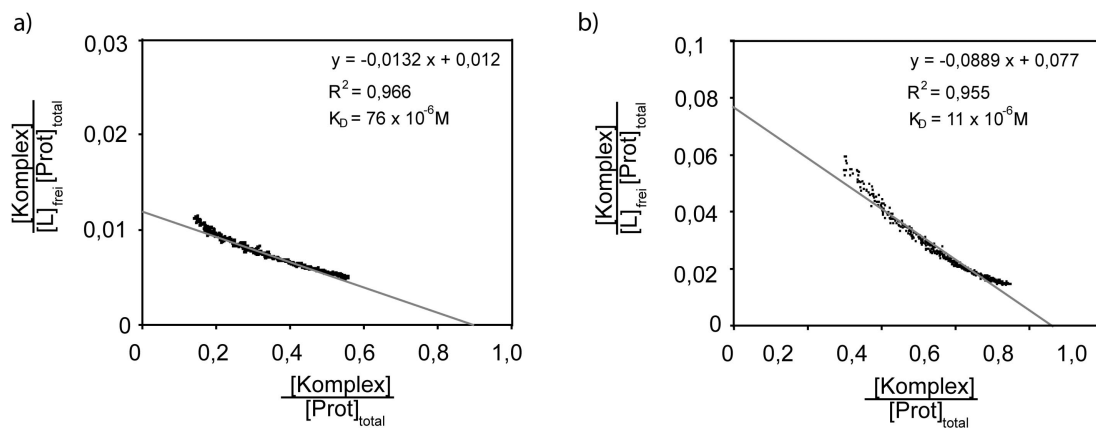
**Abb. 47: Chromatogramme (EICs) der 1:1- und 1:4-[Lys(GlcNAc<sub>3</sub>)]-Komplexe sowie des entstehenden GlcNAc<sub>3</sub>-Trimers im Zuge der Ligandkonzentrationsstudie, normiert auf 100% ihrer Maximalintensität.** a) Gesamter Konzentrationsbereich der Gradientenmessung von 0 bis 117 µM Ligand. b) Unterer Konzentrationsbereich der Gradientenmessung bis 25 µM Ligand.

Durch die Ausbildung der GlcNAc<sub>3</sub>-Oligomere wurde die Ausbildung weiterer 1:1-Protein-Ligand-Komplexe ebenfalls unterdrückt, da weniger monomeres GlcNAc<sub>3</sub> zur Komplexbildung mit freiem Lysozym zur Verfügung stand. Im Gegenzug könnte das gebildete (GlcNAc<sub>3</sub>)<sub>3</sub> für die Ausbildung der höheren 1:4-Protein-Ligand-Komplexe verantwortlich sein. Diese könnten aus der Zusammenlagerung eines 1:1-Komplexes und eines GlcNAc<sub>3</sub>-Trimers entstanden sein.

Mit Hilfe der gewonnenen Daten wurde gezeigt, dass unterschiedliche Oligosaccharide verschiedene Verhaltensweisen hinsichtlich der Komplexbildung aufweisen. Das N-Acetylglucosamin GlcNAc, welches sich bei einer Ligandkonzentration von 10 µM (wie in Kapitel 4.4.1.1 gezeigt) nicht mit Lysozym komplexieren ließ, konnte in höheren Konzentrationen Wechselwirkungen mit Lysozym ausbilden. Dabei war seine Affinität zu Lysozym vergleichsweise gering. Dies konnte insbesondere durch einen Vergleich der Signalintensitäten mit denen der GlcNAc<sub>2</sub>- bzw. GlcNAc<sub>3</sub>-Komplexe wiedergegeben werden. Höhere Komplexe entstanden bei allen verwendeten Oligosacchariden erst bei höheren Ligandkonzentrationen. Ihre Ausbildung war von der Konzentration des eingesetzten Oligosaccharids abhängig und musste aufgrund der eingeschränkten Bindungskapazität des aktiven Zentrums zum Teil auf unspezifische Bindungen an der Proteinoberfläche zurückgeführt werden.

#### 4.4.1.3 Affinitätsbestimmung – $K_D$ -Wert

Die unterschiedliche Affinität der verschiedenen Oligosaccharide zu Lysozym konnte im vorangegangenen Kapitel bereits über die Intensitäten der Komplexe abgeschätzt werden. Eine genauere Charakterisierung in Folge der Bestimmung von Dissoziationskonstanten ( $K_D$ -Werte) erfolgte mit Hilfe des Scatchard-Plots. Die  $K_D$ -Werte sind für die Liganden bekannt und können somit leicht mit Literaturdaten verglichen werden. Des Weiteren liefern die Arbeiten von Denhart *et al.* massenspektrometrische Vergleichsansätze [62, 101]. In diesen Arbeiten wurde die Bestimmung der  $K_D$ -Werte mittels Einzel-Titrationsmessungen bis zu einer Ligandkonzentration von 50 µM an einem TOF-Gerät durchgeführt. In der hier vorliegenden Arbeit konnte durch die Verwendung des Gradientensystems innerhalb einer kurzen Messdauer ein größerer Konzentrationsbereich für die Bestimmung des  $K_D$ -Wertes herangezogen werden. Ferner wurden keine Einzelproben vermessen, wodurch Lücken im Konzentrationsbereich ausgeschlossen werden konnten. Die Auftragung für das Disaccharid ist der Abb. 48 a, die Auftragung für das Trisaccharid der Abb. 48 b zu entnehmen.



**Abb. 48: Scatchard-Plots zur Bestimmung der Dissoziationskonstante für a) GlcNAc<sub>2</sub> und b) GlcNAc<sub>3</sub>.** Aufgrund eines ähnlichen Molekulargewichts von Lysozym und seinen Komplexen kann ein ähnlicher Ionisationsfaktor angenommen werden, welcher die Gleichsetzung der Signalintensitäten mit der Konzentration erlaubt. Die Konzentration an frei in der Lösung vorhandenen Liganden  $[L]_{\text{frei}}$  berechnet sich aus der bekannten Gesamtligandkonzentration zu jedem einzelnen Zeitpunkt minus der Komplexkonzentration, welche aus den Signalintensitäten von Lysozym und seinen Komplexen sowie der bekannten Lysozymkonzentration ermittelt werden konnte.

Die Scatchard-Plots der beiden Liganden weisen ein Bestimmtheitsmaß von 0,966 bzw. 0,955 auf. Aus dem negativen Kehrwert der Steigung konnten die Dissoziationskonstanten ermittelt werden. Diese liegen für GlcNAc<sub>2</sub> bei  $76 \times 10^{-6} \text{ M}$  und für GlcNAc<sub>3</sub> bei  $11 \times 10^{-6} \text{ M}$ .

Die Bestimmung des  $K_D$ -Wertes für GlcNAc mittels Scatchard-Plot war aufgrund der geringen Komplexbildung sowie der geringen Intensität des freien Liganden nicht möglich.

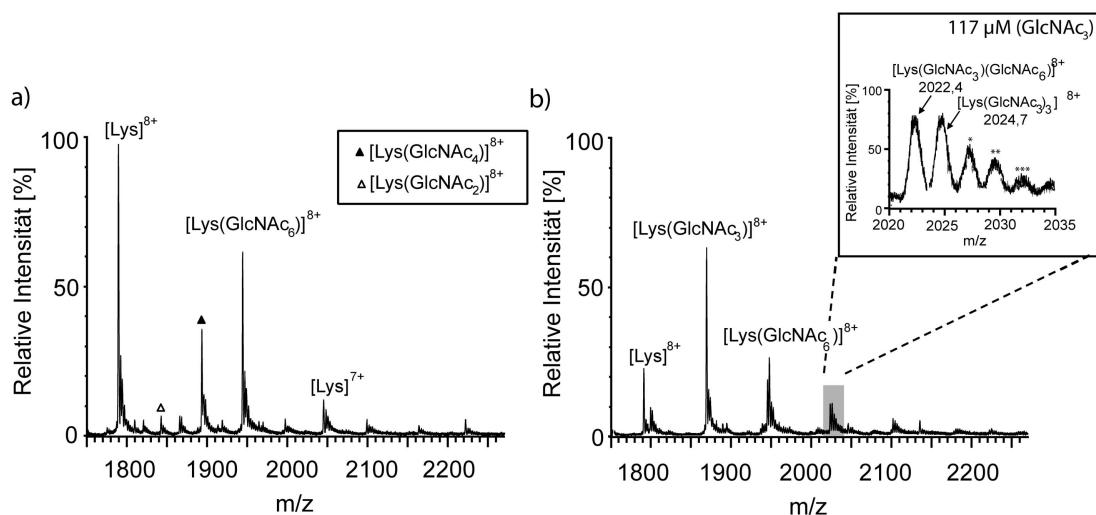
Die Ergebnisse der Konzentrationsstudien zeigen zum Einen, dass sich mit zunehmender Ligandkonzentration die Komplexbildung steigern lässt, wobei höhere Konzentrationen die unspezifische Aggregation der Liganden untereinander auslöst sowie die Anlagerung auf der Proteinoberfläche. Zum Anderen konnte gezeigt werden, dass sich die Affinität bereits an der Intensität der gebildeten Komplexe einschätzen lässt. Mit Hilfe einer Scatchard-Plot-Auftragung wurden die Affinitäten der Liganden quantitativ analysiert.

#### 4.4.1.4 Kompetitive Komplexbildung

Wie eingangs beschrieben, können mehrere Liganden um das gleiche, aktive Zentrum konkurrieren und sich in Abhängigkeit der vorliegenden Konzentration gegenseitig aus diesem verdrängen. Eine solche kompetitive Inhibierung ist für das Substrat GlcNAc<sub>6</sub> und den Inhibitor GlcNAc<sub>3</sub> bekannt. Das Ausmaß der Inhibierung wurde anhand eines Verdrängungsexperiments im Rahmen der Diplomarbeit von Tanja Köllmeier analysiert [100]. Für diese Untersuchungen wurde Lysozym mit GlcNAc<sub>3</sub> in verschiedenen Konzentrationen gemischt und anschließend durch die

Zugabe des Substrats (25  $\mu\text{M}$ ) die Verdrängung des Inhibitors aus der hydrophoben Tasche massenspektrometrisch beobachtet. Die automatisierte Durchführung der Verdrängungsexperimente konnte mit Hilfe des kontinuierlichen Flusssystems gewährleistet werden. Durch die Erweiterung mit einer externen Spritzenpumpe wurde der zweite Ligand (hier  $\text{GlcNAc}_6$ ) zudosiert (Versuchsaufbau siehe Abb. 11 b). Ein Vorteil des Flusssystems besteht darin, dass während der gesamten Messung Enzym und Substrat lediglich 70 Sekunden miteinander reagieren konnten. Dies ermöglichte zwar den Substratabbau – er ist jedoch zu jedem Zeitpunkt des Konzentrationsgradienten gleich weit vorangeschritten. Intensitätsabnahmen des  $[\text{Lys}(\text{GlcNAc}_6)]$ -Komplexes ließen sich somit nicht auf den Substratabbau, sondern auf den Einfluss des Inhibitors zurückführen.

Durch die Verdrängungsexperimente galt es herauszufinden, ab welcher Konzentration der Inhibitor so stark in der hydrophoben Tasche des Lysozyms gebunden wird, dass er vom Substrat (25  $\mu\text{M}$ ) nicht mehr verdrängt werden kann. Ebenso sollte die Frage geklärt werden, ab welcher Konzentration die Inhibierung des Substratabbaus einsetzt bzw. dieser vollkommen abgestoppt wird. Ein Spektrenvergleich mit und ohne Inhibitor zeigte deutlich einen Einfluss auf den Substratabbau. Zu Beginn des Konzentrationsgradienten war lediglich das Substrat  $\text{GlcNAc}_6$  in der Lösung vorhanden (Abb. 49 a), welches in einer hydrolytischen Reaktion zu  $\text{GlcNAc}_2$  und  $\text{GlcNAc}_4$  abgebaut wurde. Die Abbauprodukte wurden sowohl in ihrer unkomplexierten Form als 1-fach geladene Monomere, aber auch, wie in dem in Abb. 49 dargestellten  $m/z$ -Bereich ersichtlich, als 8-fach geladene Lysozym-Komplexe detektiert. Neben den detektierbaren Komplexen konnte das Protein Lysozym auch in seiner freien, unkomplexierten Form beobachtet werden. Eine Substratkonzentration von 25  $\mu\text{M}$  reichte somit nicht aus, um 5  $\mu\text{M}$  Lysozym vollständig zu binden.



**Abb. 49: MS-Spektren ( $m/z$ -Bereich 1'750-2'250, 100% = 2'810) einer kompetitiven Inhibierung des  $[\text{Lys}(\text{GlcNAc}_6)]$ -Komplexes mit unterschiedlichen  $\text{GlcNAc}_3$ -Konzentrationen.** a) Spektrum ohne die Zugabe eines Inhibitors. b) Neben 5  $\mu\text{M}$  Lysozym und 25  $\mu\text{M}$  Substrat sind in der Lösung auch 117  $\mu\text{M}$  Inhibitor  $\text{GlcNAc}_3$  enthalten. Das Substrat gelangt erst nach der Lysozym-Inhibitor-Komplexbildung in die Lösung und kann den Inhibitor verdrängen.

Die Zugabe des Inhibitors änderte die Gesamtligandkonzentration der Lösung, wodurch eine verstärkte Komplexierung des noch freien Lysozyms ausgelöst wurde (Abb. 49 b). Neben GlcNAc<sub>6</sub> konnte auch GlcNAc<sub>3</sub> an das noch frei vorliegende Lysozym binden, was sich in der Detektion von Lysozym-GlcNAc<sub>3</sub>-Komplexen bemerkbar machte. In Abb. 49 b, einem Spektrum bei maximaler Inhibitorkonzentration, wurden keine Komplexe aus Lysozym und seinen Substratabbauprodukten mehr detektiert. Im unteren m/z-Bereich wurde ein sehr geringer Anteil an 1-fach geladenen, monomeren Abbauprodukten detektiert. Auch Enzym-Substrat-Komplexe ließen sich nachweisen – wengleich zu einer geringeren Intensität. Da durch die hohe Konzentration des zugesetzten Inhibitors weniger freies Lysozym für die Komplexierung des Substrats zur Verfügung stand, konnte nur ein geringerer Anteil des GlcNAc<sub>6</sub> an Lysozym gebunden werden. Aus diesem Grund ließen sich auch nur geringe Mengen an Abbauprodukten nachweisen. Ein 4,5-facher Überschuss an Inhibitor reichte somit nicht aus, um die Substrat-Komplexbindung und den Substratabbau vollständig zu unterdrücken.

Wie man aus der Detaildarstellung in Abb. 49 b erkennen kann, bildeten sich neben reinen Lysozym-Inhibitor- und Lysozym-Substrat-Komplexen auch Komplexe, welche beide Liganden gebunden hatten. Diese Komplexe wurden bereits bei sehr geringen Inhibitorkonzentrationen detektiert, wodurch eine konzentrationsabhängige, unspezifische Komplexbildung ausgeschlossen werden konnte. Aufgrund des Versuchsaufbaus lagerte sich zuerst der Inhibitor im aktiven Zentrum des Lysozyms an, bevor sich das Substrat anlagern konnte. Dadurch war ein Teil der Lysozymbindungstasche bereits durch den Inhibitor blockiert. GlcNAc<sub>3</sub> bindet gemäß der Kristallstruktur von Blake *et al.* sowie Cheetham *et al.* an die Positionen (-3) bis (-1) (vgl. Abb. 6) [57, 102]. Aufgrund dieser Bindungspositionen wird die Chitotriose nicht hydrolysiert, da die Spaltung zwischen den Positionen (-1) und (+1) stattfindet. Die Positionen (+1) sowie (+2) sind nach der Bindung des Inhibitors noch unbesetzt und für die Bindung von weiteren Liganden verfügbar. Bindet anschließend das Substrat an die Bindungspositionen (+1) und (+2) kann es ebenfalls nicht mehr abgebaut und im Komplex detektiert werden.

#### 4.4.1.5 Spezifische und unspezifische Komplexbildung

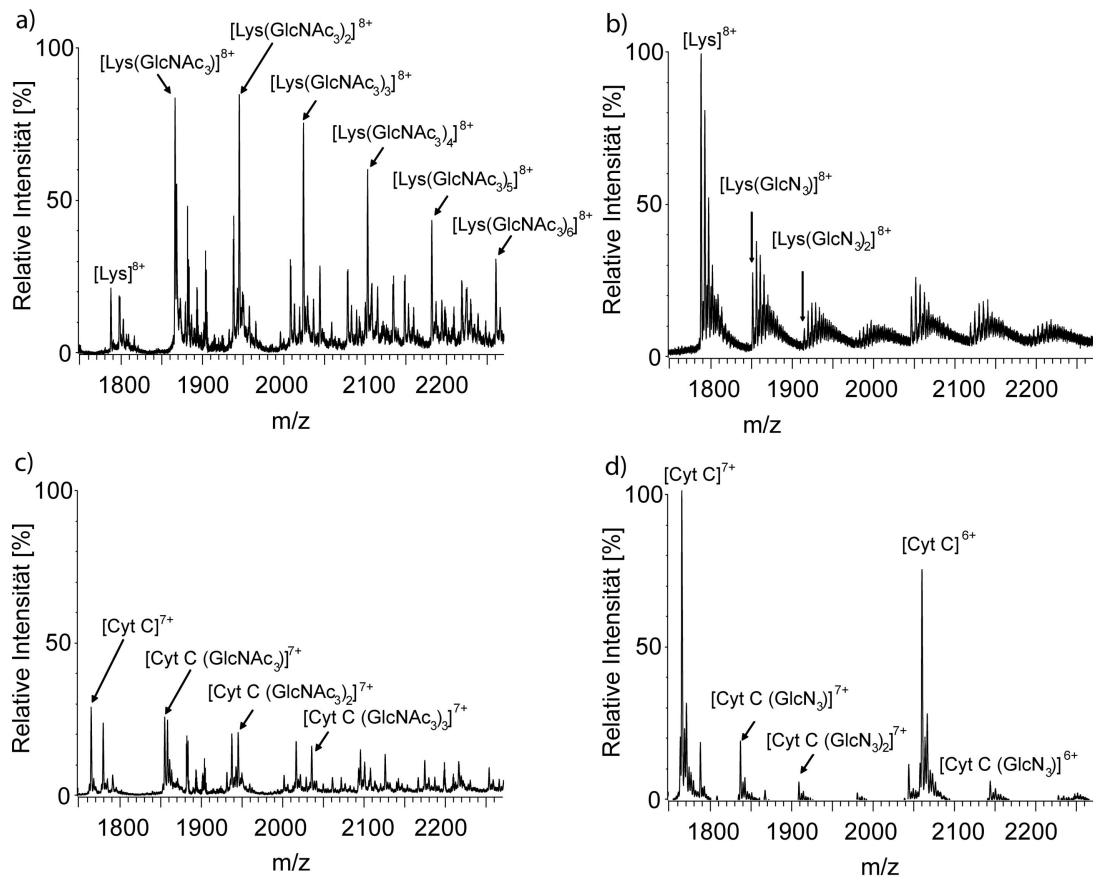
Die bisher verwendeten GlcNAc<sub>n</sub>-Liganden konnten aufgrund ihrer Acetylgruppen spezifische Wasserstoffbrückenbindungen mit Lysozym ausbilden. Dies ist aus der Kristallstruktur bekannt [57, 102]. Fehlen die Acetylgruppen, so kann die Bindung nicht mehr spezifisch an den Aminosäuren im aktiven Zentrum erfolgen.

Mit Hilfe der Massenspektrometrie wurde untersucht, ob auch nichtacetylierte Oligosaccharide, wie das GlcN<sub>3</sub>, an Lysozym binden können. Aufgrund der fehlenden Acetylketten kann die Bindung nicht spezifisch über die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen ablaufen. Bei geringen



Ligandkonzentrationen wurden keine Komplexe detektiert, weshalb die Lysozym-Ligand-Zusammensetzung für dieses Experiment geändert wurde. Die Lysozymkonzentration wurde auf 20  $\mu\text{M}$ , die des Liganden auf 1 mM erhöht. Neben der Probe mit dem nichtacetylierten  $\text{GlcN}_3$  wurde eine vergleichbare Probe mit dem acetylierten  $\text{GlcNAc}_3$ -Liganden hergestellt.

Ein Spektrenvergleich der beiden Proben ist in Abb. 50 a und b dargestellt. In den Spektren zeigte sich, dass beide Liganden von Lysozym komplexiert wurden. Die Signalintensität der  $[\text{Lys}(\text{GlcN}_3)_x]$ -Komplexe war im Vergleich zu den acetylierten  $[\text{Lys}(\text{GlcNAc}_3)_x]$ -Komplexen allerdings gering. Dies deutete auf eine schlechtere Bindung im Vergleich zu den spezifischen Liganden hin. Im Falle des acetylierten Liganden ( $\text{GlcNAc}_3$ ) konnten in Folge der hohen Ligandkonzentration auch höhere Komplexe intensiv nachgewiesen werden. Die Bildung höherer, nichtacetylierter Komplexe war vernachlässigbar.



**Abb. 50: MS-Spektren (a und b: m/z-Bereich 1'750-2'270, 100% = 1'570; c und d: m/z-Bereich 1'750-2'270, 100% = 6'330), die mit Hilfe der Signalintensitäten eine Unterscheidung zwischen spezifischer und unspezifischer Komplexbildung erlaubten.** a) In einer 20  $\mu\text{M}$  Lysozymlösung, versetzt mit einer 1 mM  $\text{GlcNAc}_3$ -Lösung, weisen hohe Signalintensitäten der entstehenden Komplexe auf die Bildung spezifischer Wechselwirkungen hin. b) Lysozymlösung, versetzt mit einer 1 mM Lösung an nichtacetylierten Liganden  $\text{GlcN}_3$ . c) In einer Cytochrom C-Lösung mit einem acetylierten Liganden können wiederum hohe Komplexintensitäten verzeichnet werden. d) Die Komplexbildung von Cytochrom C mit einem nichtacetylierten Liganden führt ebenfalls nur zu einer marginalen Komplexierung des  $\text{GlcN}_3$ .

Eine weitere Studie wurde mit Cytochrom C durchgeführt, welches sich ebenfalls mit beiden Liganden komplexieren ließ (Abb. 50 c und d). Im Falle des nichtacetylierten Liganden wiesen die Komplexe eine sehr geringe Signalintensität auf (Abb. 50 d). Die im MS-Spektrum dominierenden Signale ließen sich eindeutig unkomplexiertem Cytochrom C zuordnen. Die Signalintensitäten des freien Cytochroms waren in einer Mischung mit acetyliertem Liganden geringer und die Signale der detektierbaren Komplexe höher (Abb. 50 c). Neben 1:1-Komplexen wurden auch höhere Oligomere detektiert. Da Cytochrom C in seiner hydrophoben Tasche eine kovalent gebundene Hämgruppe beinhaltet, kann keiner der beiden Liganden in der hydrophoben Tasche binden. Der acetylierte Ligand kann aufgrund seiner Acetylgruppen jedoch an der Oberfläche des Proteins Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, welche zur Komplexbildung führen. Diese Interaktionen können beim nichtacetylierten Liganden nicht ausgebildet werden, weshalb die Komplexbildung des GlcN<sub>3</sub> für Lysozym und Cytochrom C vergleichbar gering war und auf unspezifische Wechselwirkungen zurückgeführt werden konnte. Anhand der Signalintensität kann somit eine Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen Komplexen vorgenommen werden.

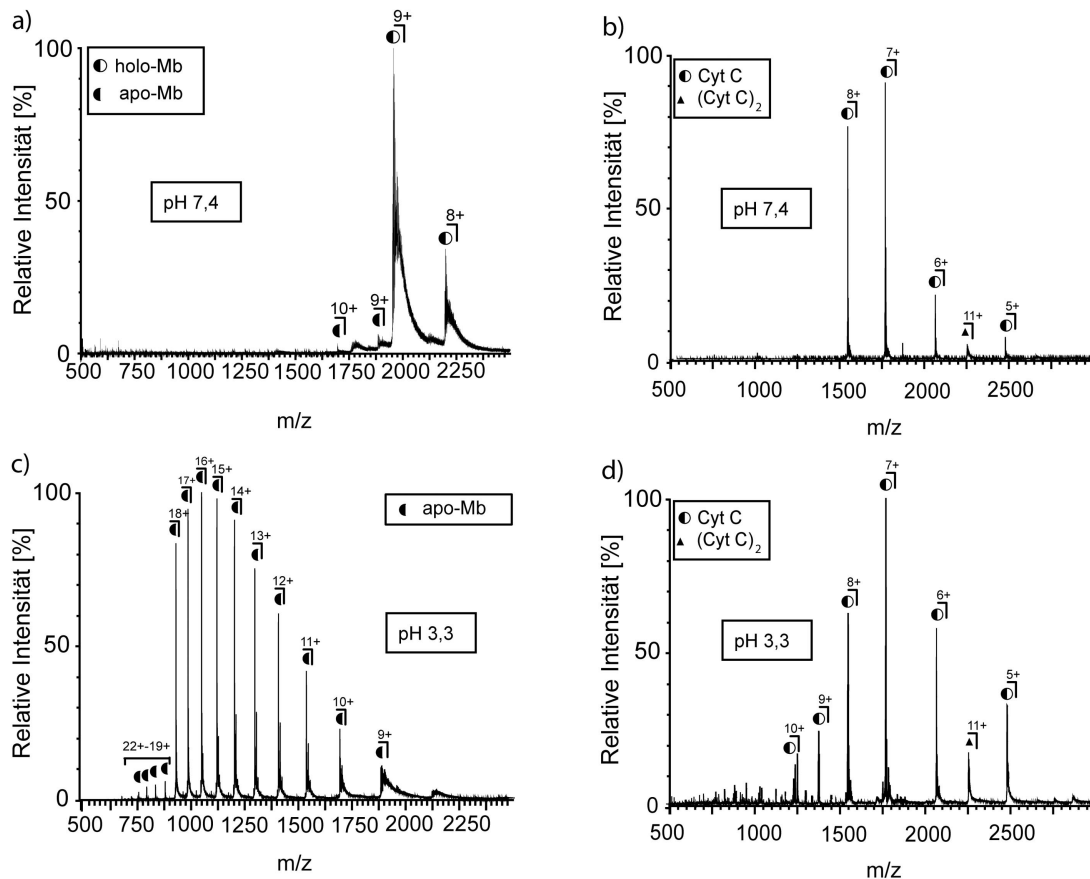
#### 4.4.2 Komplexdissoziation durch Lösungseinflüsse

Die bisher gezeigten Ergebnisse charakterisierten die Bildung nichtkovalenter Protein- und Peptid-Komplexe unter verschiedenen Einflüssen. Doch auch die Komplexdissoziation stellte einen weiteren zentralen Teil bei der Charakterisierung von Protein-Ligand-Komplexen dar. Auf diese wird anhand der Hämproteine genauer eingegangen.

##### 4.4.2.1 Komplexdissoziation durch Änderung des pH-Wertes

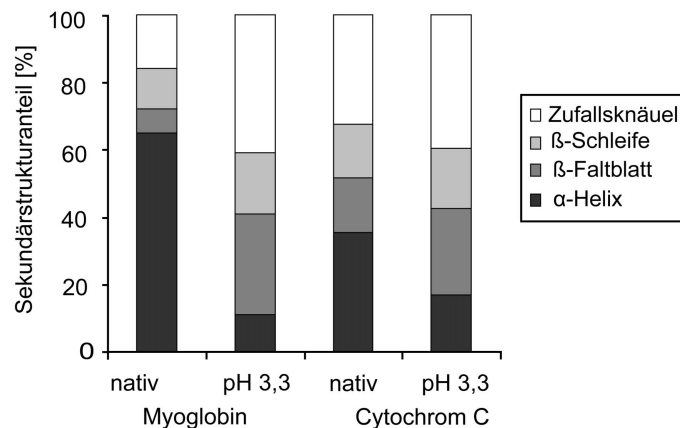
Häm-Komplexe setzen sich aus einem Protein (apo-Protein) und einem gebundenen Liganden, dem Häm, zusammen. Die komplexierte Form (holo-Protein) kann massenspektrometrisch unter nativen Bedingungen detektiert werden. Myoglobin wurde in Form von 8- und 9-fach geladenen Signalen nachgewiesen (Abb. 51 a). Die Hämgruppe ist dabei in einem hydrophoben Spalt in der Polypeptidkette über nichtkovalente Wechselwirkungen verankert. Im Falle des Cytochrom C, einem weiteren Hämprotein, erfolgt die Komplexierung der Hämgruppe über kovalente Thioetherbrücken. Der Komplex wurde unter nativen Bedingungen in den Ladungszuständen 5+ bis 8+ detektiert, wobei das 7-fach geladene Signal am stärksten ausgeprägt war (Abb. 51 b). Durch Ansäuern der Lösungen veränderten sich die MS-Spektren beider Komplexe (Abb. 51 c und d). Beim Cytochrom C trat eine Veränderung in den Signalintensitäten sowie eine Verschiebung der Ladungsverteilung zu kleineren m/z-Werten auf. Im Gegensatz dazu entstanden in einer angesäuerten Myoglobinlösung neue Signale, während die zuvor detektierbaren Signale des 8-

und 9-fach geladenen holo-Myoglobins nicht mehr nachweisbar waren. Die Dekonvolution der  $m/z$ -Werte in die molekulare Masse ergab ein Molekulargewicht von 16'951 Da. Dieses konnte dem apo-Myoglobin zugeordnet werden.



**Abb. 51: MS-Spektren (a und c:  $m/z$ -Bereich 500-2'500, 100% = 1'110 bzw. 10'000; b und d:  $m/z$ -Bereich 500-3'000, 100% = 10'700 bzw. 12'700) einer Myoglobin und Cytochrom C-Lösung bei pH 7,0 und pH 3,3. a und b) Die native Struktur einer Myoglobin- bzw. Cytochrom C-Lösung bei pH 7,0. c und d) Bei einem pH-Wert von 3,3 treten Veränderungen in den Spektren auf, welche sich Entfaltungen der Proteinstruktur zuschreiben lassen.**

Die Änderung des pH-Wertes induzierte somit die Freisetzung der Hämgruppe aus dem Protein. Im Allgemeinen werden elektrostatische Wechselwirkungen durch die Änderung des pH-Wertes beeinträchtigt. Da sich die Hämgruppe fast vollständig in der hydrophoben Tasche des Proteins befindet, sollten sich die Bindungen zwischen der Hämgruppe und dem Molekül nicht durch Lösemiteleinflüsse beeinträchtigen lassen [103]. Lediglich Strukturveränderungen des apo-Proteins erlauben der Hämgruppe den Kontakt zum umgebenden Lösemittel. Messungen mit Zirkular Dichroismus bestätigen die Veränderung der Sekundärstruktur sowohl für Myoglobin als auch für Cytochrom C in Lösungen mit einem sauren pH-Wert.



**Abb. 52: Sekundärstrukturanteile einer Myoglobin und Cytochrom C-Lösung bei pH 7,0 und pH 3,3.** Durch die Änderung des pH-Wertes wird die native Struktur der Proteine zerstört, was sich auch anhand der Massenspektren beobachten lässt (vgl. Abb. 55 c und d).

In den bereits gezeigten Massenspektren äußerte sich die Entfaltung der Proteine in einer Verschiebung der Signale zu höheren Ladungszuständen. Der Verlust der nativen Struktur beeinträchtigte die kompakte Struktur der Proteine und induzierte eine Vergrößerung der Proteinoberfläche. Folglich wurde eine verstärkte Anlagerung von Lösungsprotonen an der Proteinoberfläche ermöglicht, was zur Verschiebung der Ladungsverteilung führte. In abgeschwächter Form wurde dies auch für das Cytochrom C beobachtet. Trotzdem blieb der 7-fach geladene Komplex als dominierendes Signal der Ladungsverteilung erhalten und auch eine pH-bedingte Hämfreisetzung wurde für das Cytochrom C nicht beobachtet. Konsequenterweise wurden die kovalenten Bindungen zwischen Protein und Hämgruppe durch eine Änderung des pH-Wertes bzw. der Molekülstruktur nicht beeinträchtigt.

Im Falle des Myoglobins bewirkte die pH-bedingte Änderung der Sekundärstruktur auch die Veränderung der Tertiärstruktur des Proteins. Im Massenspektrum kann dies anhand einer Veränderung der Ladungsverteilung beobachtet werden [104]. Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand, die sich in der Kontaktfläche beider Moleküle ausbildeten, wurden aufgrund der Entfaltung der Proteinstruktur geschwächt oder sogar zerstört. In Folge dessen wurde der Ligand freigesetzt. Dies kann im Spektrum des Myoglobins durch die Detektion der apo-Myoglobinform bestätigt werden.

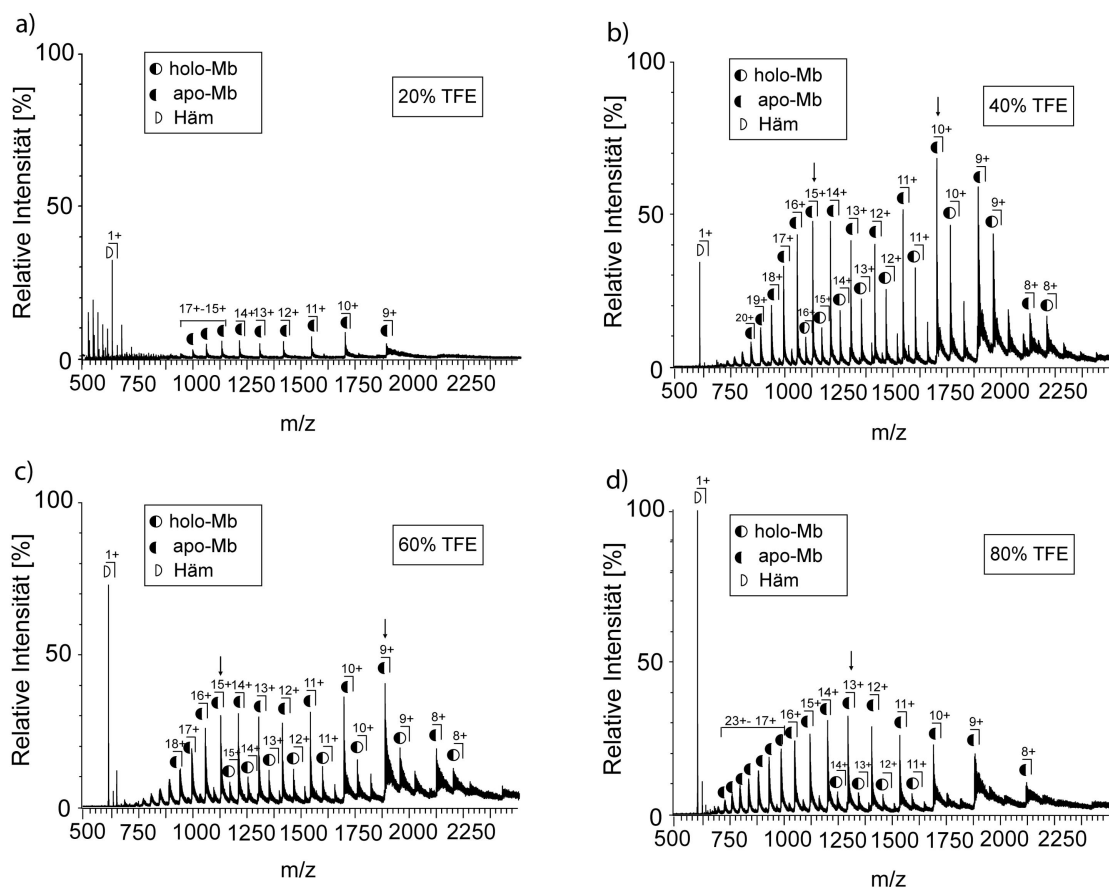
Diese Ergebnisse zeigten, dass die Existenz der nichtkovalenten Komplexe stark von der Tertiärstruktur des Proteins abhängig ist. Die Faltung bleibt unter nativen Bedingungen auch in der Gas-Phase erhalten, was durch die Detektion der nichtkovalenten Myoglobin-Komplexe beobachtet werden konnte. Ein Ansäuern der Hämproteine löste sowohl im Myoglobin als auch im Cytochrom C die Entfaltung der Tertiärstruktur aus, wobei nur für das nichtkovalente Myoglobin

eine Freisetzung der Hämgruppe ausgelöst wurde. CD-Messungen sowie die Ladungsverteilung der Massenspektren bestätigten die Entfaltung der Proteine.

#### 4.4.2.2 *Ligand-Abspaltung durch den Einsatz von Denaturierungsreagenzien*

Ähnlich wie die Änderung des pH-Wertes beeinflussen auch Denaturierungsreagenzien wie Trifluorethanol und Dithiothreitol die Hämprotein-Komplexe. Trifluorethanol kam bereits bei den VSV-Peptiden und Cytochrom b<sub>559</sub> als Helix induzierendes Lösemittel zum Einsatz. Wird es auf Myoglobin angewandt, findet eine Freisetzung der Hämgruppe statt. TFE ist auch als Denaturierungsreagenz bekannt, durch dessen Einfluss die Abspaltung des Liganden wiederum in Folge des Verlustes der nativen Konformation ausgelöst wird.

Der Einfluss unterschiedlicher TFE-Konzentrationen auf die Häm-Komplexe wurde mit einer TFE-Titration analysiert. Die Ergebnisse sind in den Abb. 53 a-d dargestellt. Bei einer geringen TFE-Konzentration von 20% wurden Signale detektiert, welche sich eindeutig dem apo-Myoglobin zuordnen ließen. Die geringe Signalintensität deutete auf eine schlechte Löslichkeit der Myoglobinprobe in 20% TFE hin (Abb. 53 a). Die Zugabe von 20% TFE löste bereits vor der massenspektrometrischen Untersuchung eine Trübung der Lösung aus. Diese erforderte die Filtration der Lösung, wodurch unlösliche Bestandteile aus der Lösung entfernt wurden. Die schlechte Intensität der MS-Signale zeigte an, dass im Filtrationsschritt auch Teile der Myoglobinlösung entfernt wurden. Die im Spektrum nachweisbaren Signale konnten der apo-Form des Proteins zugeordnet werden. Die Eigenschaften des Lösemittels liefern eine mögliche Erklärung für die Freisetzung der Hämgruppe. So neigt TFE in geringen Konzentrationen dazu, in einer TFE-Wasser-Mischung Cluster auszubilden. Diese Clusterbildung ermöglicht den TFE-Molekülen die Verkleinerung der Interaktionsfläche mit dem polaren Wasser, wobei hydrophobe Kohlenwasserstoffe und Halogengruppen des Trifluorethanol im Inneren der Cluster lokalisiert sind [84]. Peptide oder Komplexbestandteile können ebenfalls an der Aggregation teilhaben. So wäre es möglich, dass die Hämgruppe, welche im holo-Myoglobin die hydrophobe Tasche des Proteins besetzt, an der Aggregation der hydrophoben TFE-Cluster beteiligt ist und deshalb aus dem Protein herausgelöst wird. Dadurch ließe sich auch die Trübung und die schlechte Löslichkeit der Probe in 20% TFE erklären. Anhand von Röntgenstreuexperimenten wurde gezeigt, dass die Cluster nur bis zu einer TFE-Konzentration von 40% existieren können, da sie zur Separierung und Stabilisierung Wassermoleküle benötigen. Da im Massenspektrum einer 40%igen TFE-Lösung neben apo-Myoglobin auch komplexiertes holo-Myoglobin (Abb. 53 b) detektiert wurde, konnte gezeigt werden, dass die Hämgruppe in dieser TFE-Wasser-Zusammensetzung nicht mehr vollständig aus der hydrophoben Tasche herausgelöst wurde. Eine native Struktur des holo-Myoglobins, wie sie in Abb. 51 a anhand der engen Ladungsverteilung der Signale wahrgenommen wurde, konnte für Myoglobin in einer 40%igen TFE-Lösung nicht detektiert werden.



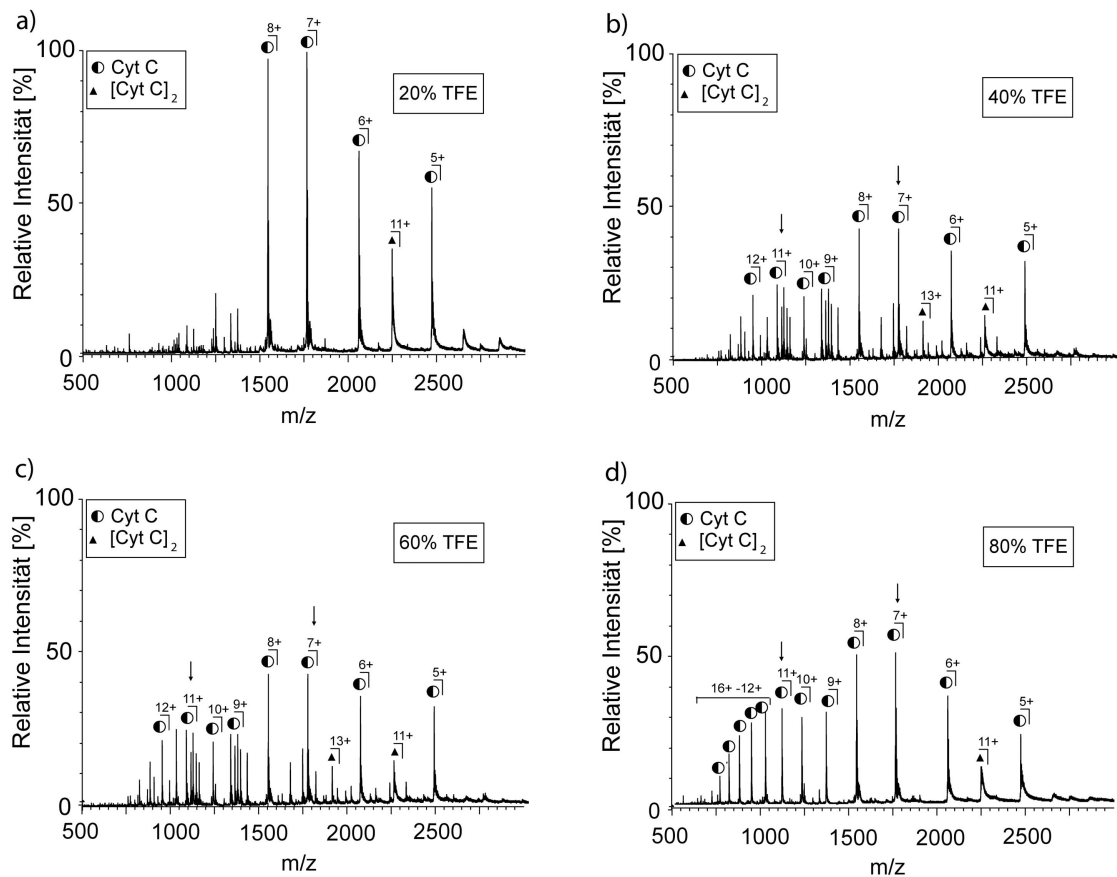
**Abb. 53:** MS-Spektren ( $m/z$ -Bereich 500-2'500, 100% = 4'530) einer Myoglobinprobe in unterschiedlichen TFE-Konzentrationen (20%-80%). Durch die Zugabe von TFE kann eine Umfaltung der Myoglobinstruktur beobachtet werden. Die in 40% TFE vorliegende, bimodale Verteilung der apo-Myoglobinsignale wird durch die Zugabe von TFE zu einer unimodalen Verteilung. Die Maxima der Verteilungen sind durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die Signalverteilung des apo-Myoglobins verlief in einer 40%igen TFE-Lösung im Gegensatz zu der des holo-Myoglobins bimodal. Als primäres Maximum konnte das 10-fach geladene apo-Myoglobin, als sekundäres Maximum das 15-fach geladene apo-Myoglobin detektiert werden. Eine solche, bimodale Ladungsverteilung wurde in der Literatur bereits für Myoglobin-Komplexe in einer mit Methanol versetzten Probe beschrieben [105]. Die Forschungsgruppe von Douglas sowie von Konermann, welche ähnliche, bimodale Ladungsverteilungen beobachten konnten, vermuteten intermediär gefaltete Zustände, die simultan nebeneinander vorliegen [105-107].

Im weiteren Verlauf der TFE-Titration verringerten sich die Intensitäten beider Maxima und glichen sich weitestgehend an (Abb. 53 c). In einer 80%igen TFE-Lösung konnte nur noch ein Maximum, das 13-fach geladene apo-Myoglobin, detektiert werden (Abb. 53 d).

Ähnliches wurde auch für Cytochrom C beobachtet (Abb. 54 a-d). Die während der TFE-Titration entstandene, bimodale Verteilung konnte wiederum als Hinweis für zwei nebeneinander existierende Zustände gedeutet werden (Abb. 54 b-d). Da keine Hämabspaltung erfolgte, wurde

von der Umfaltung des Proteins der kovalente Komplex beeinflusst. Eine dem nativen Zustand ähnliche Struktur wurde für die Ladungszustände 5+ bis 8+ vermutet. Diese Signale mit einem Maximum im Ladungszustand 7+ bzw. 8+ wurden auch in einer Cytochrom C-Lösung unter nativen Bedingungen beobachtet. (Abb. 51 b). Die entfaltete oder teilentfaltete Struktur konnte durch die Detektion der höheren Ladungszustände mit dem sekundären Maximum bei 11+ zugeordnet werden.

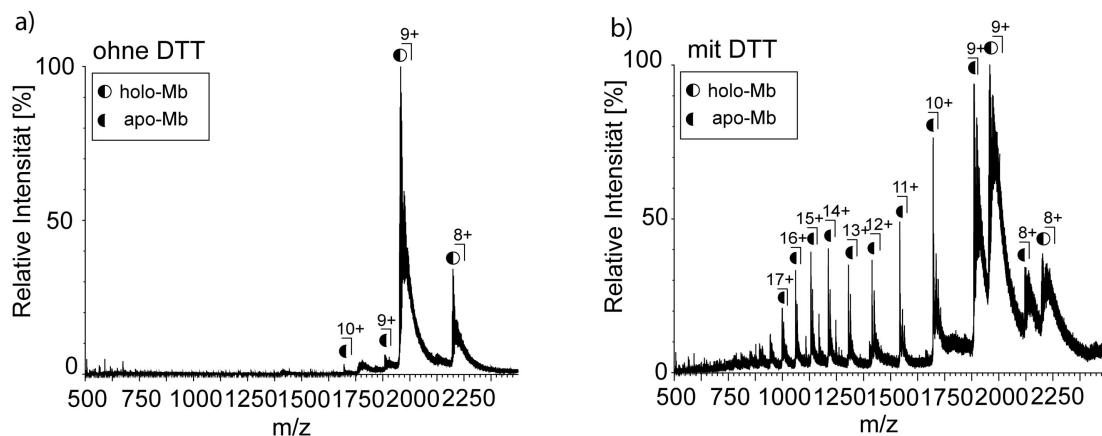


**Abb. 54:** MS-Spektren (m/z-Bereich 500-3'000, 100% = 3'740) einer Cytochrom C-Probe in unterschiedlichen TFE-Konzentrationen (20%-80%). Die Maxima der Verteilungen sind durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Ein anderes, bekanntes Denaturierungsreagenz ist Dithiothreitol (DTT). Es bewirkt die Reduktion von Disulfidbrücken innerhalb einer Polypeptidkette, wobei es zur Entfaltung des Proteins kommt. Da weder in Myoglobin noch in Cytochrom C Disulfidbrücken enthalten sind, kann diese Reaktion nicht ablaufen. In den Hämproteinen bewirkte die reduzierende Eigenschaft von DTT die Reduktion des zentralen Eisenatoms. Dieses lag aufgrund des Luftsauerstoffs in seiner oxidierten Ferri-(III)-Form vor und wurde durch die Zugabe von DTT zu Fe<sup>2+</sup> reduziert (Ferro-(II)-Form). Dadurch wurde die Nettoladung der Hämgruppe von +1 auf 0 reduziert, wie dies bereits in Kapitel 1.1.3.3 beschrieben wurde. Außerdem zeigte die mit DTT behandelte Probe Unterschiede in den detektierbaren MS-Signalen (Abb. 55 a und b). Wie auch schon bei der Zugabe von TFE bewirkte

auch Dithiothreitol den Verlust der Hämgruppe, was durch die Entstehung von apo-Myoglobin beobachtet werden konnte. Die ausbleibende, massenspektrometrische Detektion des Hämsignals konnte auf die reduzierte Nettoladung der Hämgruppe zurückgeführt werden, welche mit der Reduzierung des Eisen-Oxidationszustandes einherging.

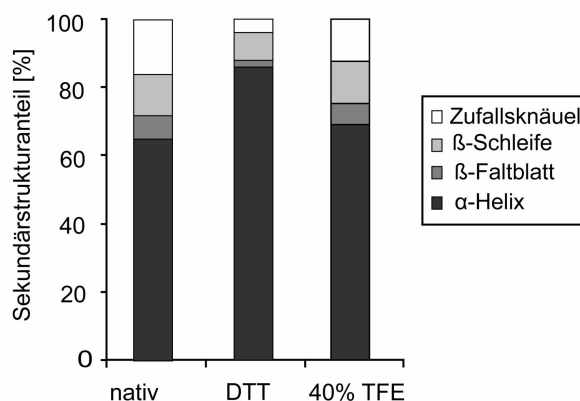
Die breite Ladungsverteilung bis hin zu 17-fach geladenem apo-Myoglobin wies abermals auf die Entfaltung der nativen Proteinstruktur hin. Des Weiteren zeigte die apo-Proteinform eine bimodale Ladungsverteilung, was wiederum auf die Koexistenz verschiedener Übergangsformen hindeutete.



**Abb. 55: MS-Spektren (m/z 500-2'500, 100% = 1'200) einer Myoglobinprobe unter dem Einfluss eines Denaturierungsreagenzes.** a) 20  $\mu$ M Myoglobin unter nativen Bedingungen (10 mM Ammoniumacetat pH 7,4). b) 20  $\mu$ M Myoglobin nach Behandlung mit 1 mM DTT.

Die Ladungsverteilung des apo-Myoglobins deckte sich nahezu mit der einer 40% TFE-Lösung (vgl. Abb. 53 b). In beiden Fällen lag das primäre Maximum bei etwa 9+, das sekundäre Maximum bei etwa 15+. Die Sekundärstrukturanteile der beiden Lösungen wurden im Vergleich zueinander in Abb. 56 dargestellt. Für die mit 40% TFE versetzte Myoglobinprobe konnte ein nahezu nativer Faltungszustand beobachtet werden. Die Zugabe von DTT bewirkte eine Steigerung der Helikalität. Die Sekundärstrukturanteile des Myoglobins wurden durch die Zugabe der Denaturierungsreagenzien nicht wesentlich beeinflusst. Aus diesem Grund war die Entfaltung der Proteine ausschließlich auf eine Entfaltung der Tertiärstruktur zurückzuführen. Proteinzustände, in welchen die Tertiärstruktur verloren geht, die Sekundärstruktur jedoch erhalten bleibt, werden *Molten Globules* genannt. In den Massenspektren konnten anhand der bimodalen Ladungsverteilung verschiedene, koexistierende *Molten Globules*-Zustände simultan detektiert werden.





**Abb. 56: Sekundärstrukturanteile einer 20 µM Myoglobinlösung unter verschiedenen, denaturierenden Bedingungen.** Die hoch helikale Struktur des Myoglobins bleibt nach der Behandlung mit 1 mM DTT (Reaktionszeit 1h) sowie unter dem Einfluss von 40% TFE ähnlich erhalten wie unter nativen Bedingungen (10 mM Ammoniumacetat pH 7,4).

## 4.5 Gas-Phasen-Stabilitäten

Die Dissoziation von Komplexen zählt, wie bereits durch die Anwendung von Denaturierungsreagenzien und durch die pH-Studien veranschaulicht wurde, ebenfalls zur Methodik der Komplexcharakterisierung. Mit Hilfe von massenspektrometrischen MS/MS-Messungen können die verwendeten Komplexe in der Gas-Phase dissoziiert werden, was die Ermittlung der Gas-Phasen-Stabilität ermöglicht. Grundlage dieser Messungen sind Kollisionen, die zwischen neutralen Gasteilchen und den Protein-Komplexen stattfinden, um die Komplexe zu dissoziieren. Die aus diesen Messungen erhaltenen Stabilitätswerte (E50%-Werte) geben dann Aufschluss über die in den Komplexen vorherrschenden Wechselwirkungen und deren Stärke. Des Weiteren liefern diese Untersuchungen erste Ansätze, um Stabilitäten verschiedener Komplexsysteme untereinander vergleichen zu können. Hierfür ist jedoch eine Normierung der ermittelten E50%-Werte auf bestimmte Komplexparameter erforderlich. Diese wurde im Folgenden durchgeführt.

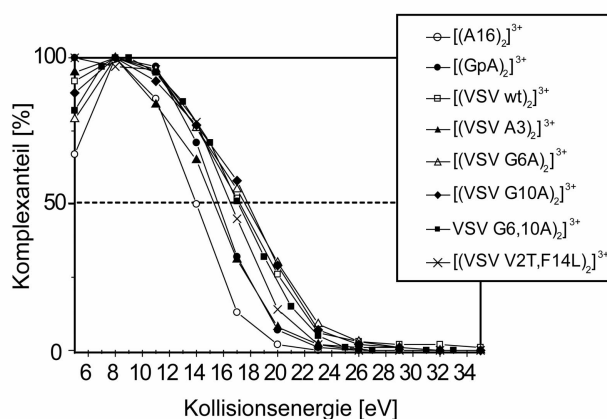
### 4.5.1 Gas-Phasen-Stabilitäten der niedermolekularen Komplexe

Zur Bestimmung von Komplexstabilitäten und Bindungsenergien stehen verschiedene Techniken wie zum Beispiel die Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technologie oder die Massenspektrometrie zur Verfügung. Letztere Methode ermöglicht durch die Fragmentierung der Komplexe die Bestimmung ihrer Stabilität. Die Ermittlung der E50%-Werte erfolgte gemäß der Beschreibung im einleitenden Teil dieser Arbeit (siehe Kapitel 1.2.2). Zuerst wurden die Stabilitäten der einzelnen Komplexsysteme untersucht, welche nach einer anschließenden Energienormierung auf diverse

Komplexparameter zu Gas-Phasen-Stabilitäten umgerechnet wurden. Dies ermöglichte einen Stabilitätsvergleich der verschiedenen Komplexsysteme.

#### 4.5.1.1 Gas-Phasen-Stabilität der VSV-Homo-Dimere

Wie in Kapitel 4.3.1 gezeigt, wurde für alle verwendeten VSV-Peptide ein vergleichbarer Oligomeranteil mit Hilfe der Massenspektrometrie nachgewiesen. Die Stabilitäten aller zu beobachtenden VSV-Dimere wurden durch die Erfassung der CID-Profile ermittelt. Die in Abb. 57 dargestellten Kurven symbolisieren die Fragmentierung der 3-fach geladenen VSV-Homo-Dimere. Zu Beginn der Dissoziationsmessung bei 5 bzw. 8 eV war die höchste Signalintensität detektierbar, welche für alle Peptid-Komplexe auf 100% normiert wurde. Aus den Kurvenverläufen ist ersichtlich, dass alle VSV-Dimere in einem ähnlichen E50%-Bereich liegen. Die VSV V2T,F14L-Mutante, welche aufgrund des eingebauten Threoninrests über eine zusätzliche Wasserstoffbrücke stabilisiert werden könnte, liegt ebenfalls im mittleren Stabilitätsbereich. Die geringste Stabilität kommt mit einem E50%-Wert von 14 eV dem Kontrollpeptid A16 zu.

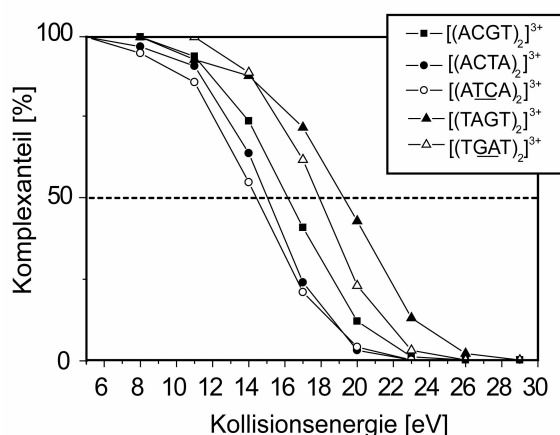


**Abb. 57:** CID-Profile der 3-fach geladenen VSV-Homo-Dimere. Die ermittelten E50%-Werte liegen alle im gleichen Stabilitätsfenster.

#### 4.5.1.2 Gas-Phasen-Stabilitäten der Peptidnukleinsäuren

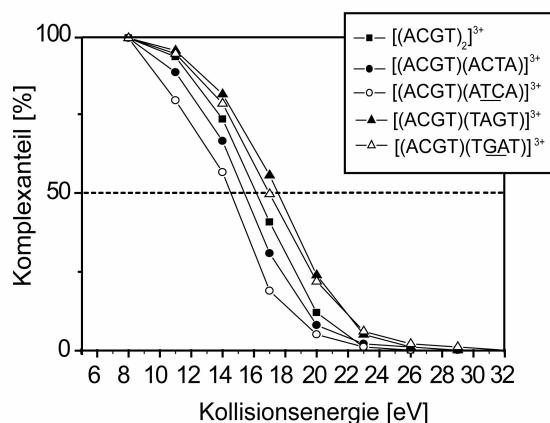
Die Peptidnukleinsäuren bieten aufgrund der funktionalisierten Seitenketten die Möglichkeit, Gas-Phasen-Stabilitäten in Abhängigkeit von der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zu untersuchen. Die in Abb. 58 dargestellten CID-Profile geben die Stabilitäten der Homo-Dimere wieder. Lediglich das ACGT-Dimer verfügt über eine vollständig komplementäre Paarung (siehe Kapitel 4.3.2.4), weshalb dieses als das stabilste Dimer hervorgehen müsste. Der E50%-Wert lag mit 16,5 eV im mittleren Stabilitätsbereich. Für die Homo-Dimere der TAGT- und TGAT-Peptide wurde eine höhere Stabilität ermittelt, während die Stabilitäten der ACTA- und ATCA-Dimere bei

geringeren Werten lagen. Da keines dieser Peptide über die Ausbildung komplementärer Basenpaarungen stabilisiert wurde, müssen, wie bereits in Kapitel 4.3.2.4 erwähnt, neben den Watson-Crick-Wechselwirkungen auch andere Interaktionen an der Oligomerisierung der PNAs beteiligt sein. Diederichsen *et al.* konnten folgende Wechselwirkungen als spezifische Interaktionen der PNAs nachweisen: A-T, T-T, C-C<sup>+</sup>, T-C und T-G [32]. Für die spiegelbildlichen ACTA- und ATCA-Homo-Dimere könnten bei antiparalleler Orientierung der Helixstränge zwei T-C-Interaktionen ausgebildet werden. Auch die spiegelbildlichen TAGT- und TGAT-Homo-Dimere würden dann unter Ausbildung zweier T-T-Wechselwirkungen stabilisiert werden. Die höhere Stabilität der TAGT- und TGAT-Homo-Dimere ließe sich dadurch jedoch nicht erklären, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass weitere Wechselwirkungen zur Stabilität der Oligomere beitragen.



**Abb. 58:** CID-Profile der 3-fach geladenen Homo-Dimere der Peptidnucleinsäuren. Der  $[(ACGT)_2]^{3+}$ -Komplex sollte aufgrund der komplementären Basenpaarung die höchste Stabilität aufweisen. Mit einem E50%-Wert von 16,5 eV liegt dieser im mittleren Bereich des Stabilitätsfensters.

Auch die Gas-Phasen-Stabilitätsbestimmung der ACGT-Hetero-Dimere (vgl. Abb. 36) wurde untersucht. Die E50%-Werte dieser Dimere gliederten sich in einem ähnlichen Stabilitätsbereich ein, wie die zuvor untersuchten Homo-Dimere (Abb. 59).

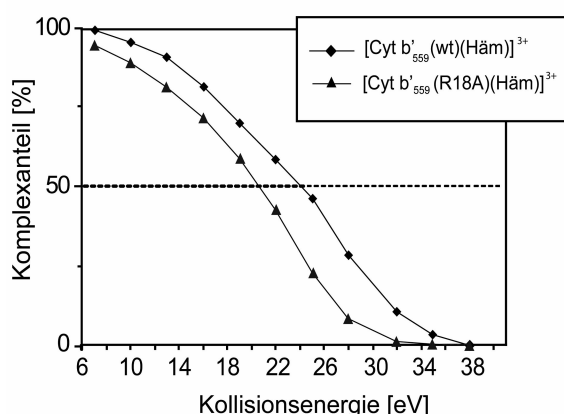


**Abb. 59:** CID-Profile der 3-fach geladenen ACGT-Hetero-Dimere. Die E50%-Werte lassen sich in einem ähnlichen Stabilitätsfenster einordnen, wie die bereits gezeigten PNA-Homo-Dimere.

#### 4.5.1.3 Gas-Phasen-Stabilitäten der Cytochrom $b'_{559}$ -Komplexe

Die Bestimmung der Gas-Phasen-Stabilität der beiden Cytochrom  $b'_{559}$ -Komplexmutanten wurde über die Abspaltung der Hämgruppe analysiert. Mit Hilfe dieser Messungen konnte untersucht werden, in welchem Komplex die Hämgruppe stärker mit der Polypeptidkette verankert ist. Obwohl sich der Austausch von Arginin in Position 18 nicht auf die Komplexbildung zwischen Häm und dem Peptid auswirkte (vgl. Abb. 39), könnte die geladene Aminosäure trotzdem zu einer stabileren und stärkeren Bindung der Hämgruppe beitragen. Dies wurde anhand massenspektrometrischer Dissoziationsmessungen untersucht. Die CID-Profile der 3-fach geladenen Cytochrom  $b'_{559}$ -Häm-Komplexe sind der Abb. 60 zu entnehmen.

Aus den CID-Kurven wird ersichtlich, dass der Wildtyp-Komplex mit 24 eV eine marginal höhere Stabilität ausweist, als die Mutante mit einem Wert von 21 eV. Verglichen mit den bereits dargestellten VSV-Peptiden und Peptidnukleinsäuren lassen sich auch die Stabilitäten der Cytochrom  $b'_{559}$ -Komplexe im gleichen E50%-Bereich einordnen.



**Abb. 60: CID-Profile der 3-fach geladenen Cytochrom  $b'_{559}$ -Häm-Komplexe.** Die ermittelten Gas-Phasen-Stabilitäten weisen auf ähnliche Interaktionen zwischen der Hämgruppe und den jeweiligen Mutanten hin.

#### 4.5.1.4 Zusammenfassung der Gas-Phasen-Stabilitäten niedermolekularer, nichtkovalenter Komplexe

Die vorangegangenen Ergebnisse, welche aus den CID-Messungen der niedermolekularen Peptide hervorgingen, wiesen unabhängig vom verwendeten Komplexsystem Homologien auf. So ordneten sich die Stabilitätswerte der verschiedenen Komplexsysteme in einem sehr engen E50%-Fenster von 2-5 eV an. Die Stabilitäten aller VSV-Dimere umfassten einen E50%-Bereich von 16-18 eV, die der PNA-Dimere lagen im Bereich von 15-20 eV und die der Cytochrom  $b'_{559}$ -Peptide im Bereich von 21-24 eV. Da *a priori* für die E50%-Werte von einem Fehler von  $\pm 1,5$  eV ausgegangen werden kann, ließen sich bei den einzelnen Komplexsystemen keine oder nur geringfügige Stabilitätsunterschiede nachweisen. Der Stabilitätsunterschied der Cytochrom  $b'$

Peptide lag genau an der Grenze der Unterscheidbarkeit, weshalb variable Wechselwirkungen in den verschiedenen Mutanten nicht exakt nachgewiesen werden konnten.

Auch die Stabilitätsunterschiede der PNA-Dimere, welche sich aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen enorm unterscheiden sollten, waren zu gering, als dass sie mit Hilfe der E50%-Werte wahrgenommen werden konnten. Die Vermutung, dass die E50%-Werte linear mit der sich ausbildenden Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen ansteigen, war ebenfalls nicht verifizierbar.

Aus diesen Ergebnissen wurde weiterhin deutlich, dass sich zwischen den verschiedenen Systemen des niedermolekularen Komplexbereichs keine signifikanten Stabilitätsunterschiede abzeichnen lassen. Aufgrund der Tatsache, dass alle drei Komplexsysteme über unterschiedliche Arten von Wechselwirkungen stabilisiert werden, waren Varianzen in den Stabilitäten zu erwarten. Da diese mit den durchgeführten, kollisions-induzierten Messungen nicht nachgewiesen werden konnten, wurden die Stabilitäten dieser Komplexsysteme als untere Nachweisgrenze der CID-Technik eingestuft. Die Stabilitätsunterschiede der einzelnen Systeme sowie der verschiedenen Systeme untereinander scheinen demnach zu gering, um sie mittels der CID-Methodik nachweisen zu können.

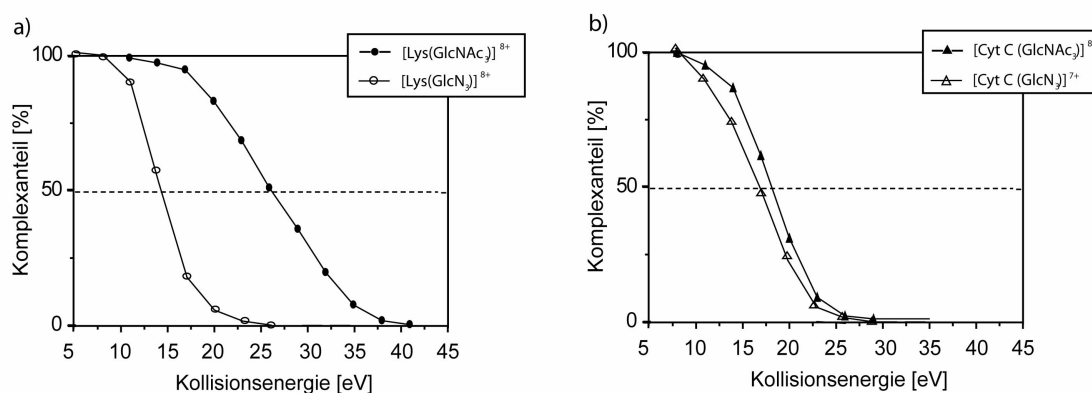
#### **4.5.2 Gas-Phasen-Stabilitäten der höhermolekularen Komplexe**

Die Charakterisierung der Gas-Phasen-Stabilitäten der niedermolekularen Komplexe ermöglichte, wie eben gezeigt, eine Einordnung der unteren Nachweisgrenze für CID-Messungen. Bei den höhermolekularen Protein-Komplexen ließen sich im Folgenden eindeutige und signifikante Stabilitätsunterschiede nachweisen. So konnten zum Beispiel spezifische und unspezifische Komplexe anhand ihrer E50%-Werte voneinander unterschieden werden.

##### *4.5.2.1 Stabilitäten spezifischer und unspezifischer Komplexsysteme*

Auf die Unterscheidung von spezifischen und unspezifischen Komplexen wurde bereits in Kapitel 4.4.1.5 für das Lysozysystem durch den Einsatz verschiedener Liganden eingegangen (vgl. Abb. 50). Unspezifische Komplexe wiesen eine geringere Signalintensität auf, welche sich durch die Verwendung höherer Ligandkonzentrationen marginal steigern ließ. Die geringere Signalintensität gegenüber spezifischen Komplexen blieb dabei erhalten. Nachfolgende CID-Messungen sollten Stabilitätsunterschiede der verschiedenen Komplexe darstellen. Für diesen Stabilitätsvergleich wurden 7- bzw. 8-fach geladene Komplexe herangezogen, da in den Spektren der Lysozymproben diese Ladungszustände gegenüber den Anderen dominierten (Abb. 61 a). Untersucht wurden die

Lysozym-Komplexe mit einem acetylierten ( $\text{GlcNAc}_3$ ) und einem nichtacetylierten ( $\text{GlcN}_3$ ) Liganden, deren CID-Profile in Abb. 61 a dargestellt sind.



**Abb. 61: CID-Profile der Lysozym- und Cytochrom C-Komplexe mit verschiedenen Liganden.** a) Dissoziationsprofile der acetylierten und nichtacetylierten Lysozym-Komplexe. b) Dissoziationsprofile der acetylierten und nichtacetylierten Cytochrom C-Komplexe.

Für den  $[\text{Lys}(\text{GlcNAc}_3)]$ -Komplex wurde ein E50%-Wert von 26 eV ermittelt, welcher um 10 eV höher war als der E50%-Wert des nichtacetylierten  $[\text{Lys}(\text{GlcN}_3)]$ -Komplexes. Die höhere Stabilität des  $[\text{Lys}(\text{GlcNAc}_3)]$ -Komplexes bestätigte die spezifischen Interaktionen zwischen Lysozym und  $\text{GlcNAc}_3$ , welche über die Acetylgruppen des Liganden in Form von Wasserstoffbrücken ausgebildet wurden. Im  $\text{GlcN}_3$ -Liganden fehlen diese Acetylgruppen, weshalb keine Wasserstoffbrücken gebildet werden und sich der Ligand unspezifisch an das Protein anlagert. Aufgrund der fehlenden Wechselwirkungen wurde die Stabilität der Komplexe beeinflusst, wobei der unspezifische  $[\text{Lys}(\text{GlcN}_3)]$ -Komplex als der weniger stabile Komplex hervorging.

Auch Cytochrom C ließ sich mit beiden Liganden komplexieren. Der E50%-Wert des  $[\text{Cyt}(\text{GlcNAc}_3)]$ -Komplexes war mit 18 eV nur geringfügig höher als der E50%-Wert des  $[\text{Cyt}(\text{GlcN}_3)]$ -Komplexes mit 16 eV (Abb. 61 b). Eine Erklärung hierfür ergibt sich aus der Struktur des Cytochroms. Auch dieses Protein verfügt über eine hydrophobe Tasche – diese ist jedoch aufgrund der kovalent gebundenen Hämgruppe bereits besetzt, weshalb die Bindung der zugegebenen Liganden unspezifisch an der Proteinoberfläche erfolgen musste.

Vergleicht man die Stabilitätswerte der Cytochrom C-Komplexe mit denen der Lysozym-Komplexe, so fällt auf, dass in beiden Fällen zur Freisetzung der nichtacetylierten Liganden eine Kollisionsenergie von 16 eV aufgewandt werden musste. Durch die fehlenden Acetylgruppen hatte der Bindungsort des Liganden keinen Einfluss auf die Stabilität der Komplexe. Sowohl eine Bindung im aktiven Zentrum als auch die Anlagerung auf der Proteinoberfläche erfolgte mit der gleichen Bindungsstärke, was in diesem Fall auf eine unspezifische Anlagerung der Liganden zurückgeführt werden konnte. Anders verhielt es sich mit den acetylierten Liganden. Bindet

GlcNAc<sub>3</sub> im Proteininneren, wie es beim Lysozym der Fall ist, bilden sich zu Eines Wasserstoffbrücken zwischen den Acetylgruppen und dem Protein aus, welche zur Stabilität der Komplexe beitragen. Zum Anderen stärken hydrophobe Wechselwirkungen, welche durch die umhüllende Struktur des Proteins entstehen können, die Bindung des Liganden. Bindet der Ligand hingegen unspezifisch auf der Proteinoberfläche, wie es im Cytochrom C der Fall ist, wird dieser weniger stark an das Protein gebunden. Die hydrophoben Kontakte zwischen dem Liganden und dem Protein sind auf der Proteinoberfläche schlechter ausgeprägt und auch die Anzahl weiterer nichtkovalenter Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrücken, sind auf der Proteinoberfläche geringer. Dies erklärt, weshalb der [Lys(GlcNAc<sub>3</sub>)]-Komplex gegenüber dem [Cyt(GlcNAc<sub>3</sub>)]-Komplex eine um 8 eV höhere Stabilität aufwies.

Die aus diesen CID-Messungen ermittelten E50%-Werte zeigten eindeutig einen Stabilitätsunterschied zwischen spezifischen und unspezifischen Komplexen. Dabei ist es wichtig zu erwähnen, dass es sich um einen Stabilitätsunterschied handelt und bis *dato* keine absoluten Stabilitäten ermittelt wurden. Außerdem können Komplexe, die einen E50%-Wert von 16 eV aufweisen, nicht grundsätzlich als unspezifische Komplexe eingeordnet werden. Um exakte Stabilitätswerte zu erhalten, mussten die E50%-Werte auf einige Komplexparameter normiert werden, wie dies am Ende dieser Arbeit durchgeführt wurde.

#### 4.5.2.2 Stabilitätsabnahme in Folge von Proteinentfaltungen

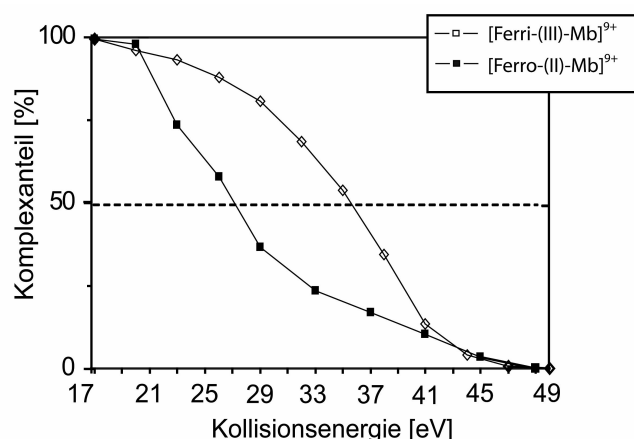
In den Massenspektren der Hämproteine konnte durch die Zugabe von Denaturierungsreagenzien wie z. B. TFE eine Verbreiterung der Ladungsverteilung beobachtet werden. Dieser Effekt deutete auf die Entfaltung der Proteinstruktur hin. Trotz dieser Entfaltung konnten in den verschiedenen TFE-Wasser-Mischungen holo-Myoglobin-Komplexe detektiert werden, deren Stabilitäten mit CID-Messungen untersucht wurden. Die E50%-Werte der 9-fach geladenen holo-Myoglobin-Komplexe aus verschiedenen TFE-Lösungen sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Dabei zeichnete sich eine Stabilitätsabnahme für Myoglobin-Komplexe in Lösungen mit höheren TFE-Konzentrationen ab. Die in den verschiedenen TFE-Lösungen enthaltenen holo-Myoglobin-Komplexe lagen somit nicht mehr in ihrer ursprünglichen, nativen Struktur vor, sondern bereits als teilentfaltete Konstrukte. Durch diese Messungen konnte gezeigt werden, dass für Myoglobin mehrere *Molten Globules* ähnliche Komplexe existieren – in jeder TFE-Konzentration ein Anderer. Die kleiner werdenden E50%-Werte zeigten außerdem, dass mit zunehmender TFE-Konzentration die Entfaltung der Struktur zunahm, wodurch die Interaktion zur Hämgruppe schrittweise geschwächt wurde. In den MS-Spektren wurde dies mit einer schlechteren Komplexdetektion beobachtet.

**Tabelle 8: E50%-Werte von [holo-Mb]<sup>9+</sup> aus Proben mit unterschiedlichem TFE-Gehalt.**

TFE-Gehalt	E50%
0%	36 eV
20%	31 eV
40%	29 eV
60%	23 eV
80%	15 eV

Die Verwendung eines anderen Denaturierungsreagenzes bewirkte nicht nur die Entfaltung der Proteinstruktur, sondern auch die Oxidation des Eisenatoms der Hämgruppe. Je nach Oxidationszustand unterscheidet man zwei verschiedene Myoglobinformen – das Ferro-(II)-Protein und das Ferri-(III)-Protein. Anhand der Massenspektren konnten die beiden Formen nicht voneinander unterschieden werden (vgl. Abb. 55). Allein die Ladungsverteilung des apo-Myoglobins erlaubte die Differenzierung zwischen der reduzierten und der oxidierten Probe.

Eine Entfaltung der Proteinstruktur durch die Zugabe von DTT konnte anhand einer breiten Ladungsverteilung lediglich für das apo-Protein nachgewiesen werden. Der Ferro-(II)-Myoglobin-Komplex aus der mit DTT versetzten Probe lag in den Ladungszuständen 8+ und 9+ vor, wie auch das Ferri-(III)-Myoglobin unter nativen Bedingungen. Eine Veränderung oder Entfaltung der nativen Struktur des Komplexes konnte somit aus dem Massenspektrum nicht ermittelt werden. Ein Stabilitätsvergleich zwischen dem Ferro-(II)-Myoglobin und dem Ferri-(III)-Myoglobin deutete jedoch eine geringere Stabilität für das Ferro-(II)-Myoglobin an (Abb. 62).



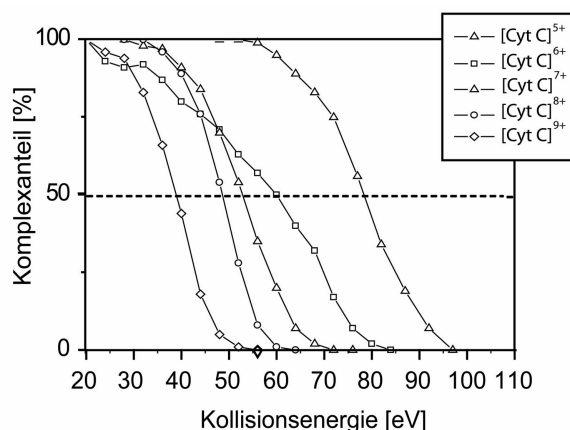
**Abb. 62: CID-Profil von 9-fach geladenem Ferri-(III)- und Ferro-(II)-Myoglobin.** Ferro-(II)-Myoglobin entsteht aus der oxidierten Ferri-(III)-Myoglobinform durch die Zugabe von Dithiothreitol. Ferro-(II)-Myoglobin besitzt einen um 9 eV geringeren E50%-Wert als Ferri-(III)-Myoglobin.



Da eine Entfaltung der Komplexstruktur ausgeschlossen werden konnte, musste die verringerte Stabilität des Ferro-(II)-Myoglobins auf die Reduktion des Eisenatoms zurückgeführt werden. Eine Stabilitätserniedrigung deutet auf eine Schwächung der Wechselwirkungen zwischen der Hämgruppe und dem Protein hin. Auf diese Möglichkeit wird zu einem späteren Zeitpunkt dieser Arbeit detailliert eingegangen.

#### 4.5.3 Normierung der ermittelten Gas-Phasen-Stabilitäten

Die in dieser Arbeit untersuchten Peptid- und Proteinsysteme interagierten über verschiedene Wechselwirkungen entweder mit sich selbst oder mit anderen Peptiden. Unterschiedliche Interaktionen sowie eine variable Anzahl dieser Interaktionen sind für verschiedene Komplexstabilitäten verantwortlich. Die Stabilitäten innerhalb der einzelnen Komplexsysteme wurden bereits über die Bestimmung der E50%-Werte untersucht. Ein Stabilitätsvergleich der verschiedenen Komplexsysteme miteinander erforderte die Normierung der E50%-Werte hinsichtlich spezifischer Komplexeigenschaften. Aufgrund unterschiedlicher Ionisierungen konnten nicht alle Protein- und Peptid-Komplexe in den gleichen Ladungszuständen detektiert werden. Um dennoch einen Vergleich der verschiedenen Systeme miteinander zu ermöglichen, musste der Einfluss des Ladungszustandes auf den E50%-Wert analysiert werden. Hierfür eignete sich die Fragmentierung des Cytochrom C-Komplexes, welcher in den Ladungszuständen 5+ bis 9+ detektiert werden konnte. Obwohl sich die Komplexe lediglich in ihrem Ladungszustand unterschieden und alle der gleichen Cytochrom C-Lösung angehörten, verringerten sich die E50%-Werte mit zunehmendem Ladungszustand (Abb. 63).



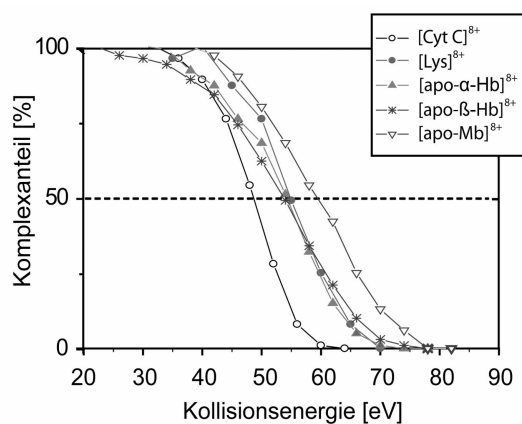
**Abb. 63: CID-Kurven von Cytochrom C-Komplexen unterschiedlicher Ladungszustände.** Die Dissoziation höher geladener Komplexe erfolgte, wie anhand der ermittelten E50%-Werte ersichtlich, bei geringeren Kollisionsenergien. Dies lässt sich jedoch nicht auf Stabilitätsunterschiede zurückführen, sondern spiegelt den Ladungseinfluss auf die Beschleunigung der Ionen und deren Dissoziation wider.

Die Kollisionsenergie entspricht, wie einleitend erklärt, der Beschleunigungsspannung, welche sich auf ein Ion bis zum Eintritt in die Kollisionszelle auswirkt. Auf diese Weise wird die Geschwindigkeit der Ionen gesteuert. Höher geladene Ionen erfahren aufgrund einer stärkeren Anziehung bereits bei geringeren Beschleunigungsspannungen (Kollisionsenergien) eine höhere Geschwindigkeit, welche für die Fragmentierung der Komplexe ausreicht. Komplexe mit geringerer Ladung hingegen müssen in einem stärkeren Spannungsfeld beschleunigt werden, um die gleiche Geschwindigkeit zu erreichen. Die E50%-Werte unterschiedlich geladener Komplexe können somit nicht zum Stabilitätsvergleich herangezogen werden. Die Multiplikation der E50%-Werte mit der entsprechenden Ladung ( $z$ ) normiert die E50%-Werte der Systeme, so dass für alle untersuchten Cytochrom C-Komplexe ähnliche Stabilitätswerte mit einer mittleren Abweichung von 3,5% erhalten werden konnten (siehe Anhang). Gleiches galt für die apo-Myoglobin-Komplexe. Der um die Ladung normierte E50%-Wert kann mit der kinetischen Energie, in welcher ebenfalls die Geschwindigkeit ( $v$ ) der Komplexe eine entscheidende Rolle spielt, gleichgesetzt werden (Formel (2)).

$$E_{kin} = \frac{1}{2} \mu \cdot v^2 = z \cdot E50\% \quad (2)$$

Das in der Formel (2) enthaltene  $\mu$  entspricht der reduzierten Masse ( $\mu = m_p \cdot m_g / (m_p + m_g)$ ) des Systems, wobei  $m_p$  und  $m_g$  für die Massen des Vorläuferions (*precursor ion*) und des Gases stehen [108].

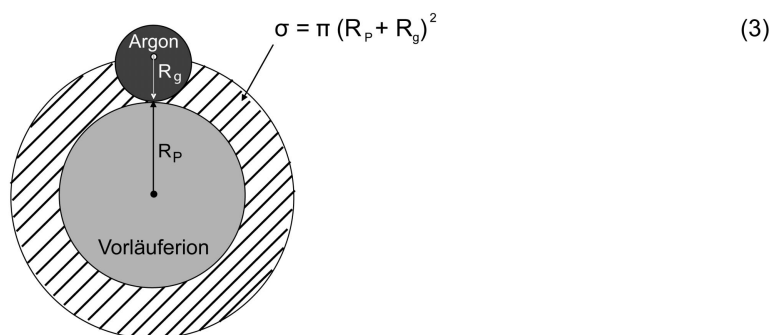
Eine weitere Komplexeigenschaft, welche Einfluss auf die Gas-Phasen-Stabilitäten (E50%-Werte) nimmt, ist die Masse der Komplexe. Deutlich wird dieser Einfluss bei einem Vergleich der CID-Profile der kovalenten Bindungsbrüche (Abb. 64). Da deren Bindungsenthalpien ebenfalls in einem ähnlichen Bereich liegen, sollten unter Berücksichtigung des gleichen Ladungszustandes diese Komplexe sehr ähnliche E50%-Werte aufweisen. Die ermittelten E50%-Werte befanden sich im Bereich zwischen 48 und 60 eV.



**Abb. 64: CID-Kurven verschiedener 8-fach geladener, kovalenter Komplexe.** Die Komplexe unterscheiden sich lediglich in ihrer Masse, was die unterschiedlichen E50%-Werte erklärt. Für die Dissoziation des schweren apo-Myoglobins werden 12 eV mehr benötigt als zur Dissoziation des leichteren Cytochrom C.

Der Massebereich der Proteine erstreckte sich von 12'359 Da für das Cytochrom C bis 16'951 Da für das apo-Myoglobin. Dabei ging das apo-Myoglobin als schwerstes Molekül hervor, welches zugleich auch den höchsten E50%-Wert aufwies. Für Cytochrom C als leichtestes Molekül konnte der geringste E50%-Wert verzeichnet werden. Die Dissoziation schwerer Proteine erforderte somit eine höhere Kollisionsenergie bzw. eine höhere Beschleunigungsspannung. Auch in diesem Fall spielte die Anziehung der Moleküle aufgrund der angelegten Beschleunigungsspannung eine entscheidende Rolle. Um alle Ionen auf eine gleiche Geschwindigkeit zu beschleunigen, muss für schwerere Moleküle aufgrund ihrer Trägheit eine stärkere Spannung angelegt werden als für Leichtere. Die Molekülmasse muss daher, wie auch die Ladung, in die Normierung der E50%-Werte einbezogen werden. Die Einbeziehung der Proteinmasse erfolgte nicht über eine einfache Multiplikation mit dem E50%-Wert. Sie wurde in einer genauen Energieberechnung zu einem späteren Zeitpunkt (Formel (7) und (8)) behandelt.

Ähnlich wie die Masse der Moleküle übte auch deren räumliche Struktur einen Einfluss auf die ermittelten Gas-Phasen-Stabilitätswerte aus. Die Wahrscheinlichkeit einer Kollision zwischen Argon und Proteinen ist bei voluminösen Vorläuferionen größer als bei Kleineren. Dies wird über den Stoßquerschnitt definiert, welcher angibt, ob zwei Teilchen mit definierten Radien miteinander kollidieren. Er lässt sich über die Radien beider Teilchen (Abb. 65) mit Formel (3) berechnen und ist vom Volumen der Moleküle abhängig.



**Abb. 65: Schematische Darstellung von zwei kollidierenden Teilchen zur Definition des Stoßquerschnitts.** Über den Stoßquerschnitt wird der Abstand definiert, den zwei Teilchen maximal einnehmen können, um miteinander zu kollidieren. Dieser wird über die Kreisfläche bestimmt, welche sich aus der Summe der beiden Teilchenradien berechnet.

Der van-der-Waals Radius von Argon ( $R_g$ ) ist mit  $0,0191 \text{ \AA}$  bekannt, während der Radius des Vorläuferions (*precursor*,  $R_p$ ) von System zu System variiert. Für Proteine, welche mittels Röntgenstrukturbeugung oder NMR bereits analysiert wurden, sind Festkörper-Strukturdimensionen bekannt. Diese konnten ansatzweise für die Berechnung des Stoßquerschnitts eingesetzt werden. Aus der pdb-Struktur (1HRC) des Cytochrom C wurden die Dimensionen  $36 \times 34 \times 27 \text{ \AA}$  ausgelesen, welche mit den von Dickerson *et al.* publizierten Dimensionen ( $30 \times 34 \times 34 \text{ \AA}$ ) gut übereinstimmen [109]. Aus den Durchmessern der drei Dimensionen ließ sich über den Mittelwert dieser ein mittlerer Radius von  $16,2 \text{ \AA}$  berechnen. Der

Stoßquerschnitt betrug nach Formel (3)  $823 \text{ \AA}^2$ . Auch für Myoglobin war die Kristallstruktur des holo-Komplexes bekannt (1WLA), womit sich der Stoßquerschnitt für das holo-Myoglobin auf  $1'221 \text{ \AA}^2$  abschätzen ließ. Für das unkomplexierte apo-Myoglobin wurden keine Daten zu einer vorliegenden Kristallstruktur gefunden. Zur Ermittlung des Stoßquerschnitts wurde näherungsweise die Struktur des holo-Myoglobins herangezogen. Auch die Kristallstrukturen der niedermolekularen Peptid-Komplexe (VSV-Peptide, PNAs und Cyt b'<sub>559</sub>) wurden mit der hier verwendeten Primärstruktur noch nicht analysiert. Ihre Dimensionen konnten anhand der bekannten Strukturparameter für eine  $\alpha$ - bzw. 14-Helix abgeschätzt werden. Die verwendeten Parameter sind in den Kapiteln 1.1.2 und 1.1.3.2 zu finden. Die Berechnung des Stoßquerschnitts anhand von Festkörper-Strukturdimensionen bringt die Problematik mit sich, dass sich die Strukturen der Komplexe in der Gas-Phase deutlich von Festkörperstrukturen unterscheiden können. Dies wurde in der Berechnung des Stoßquerschnitts nicht berücksichtigt, weshalb die Problematik der realen Strukturdimensionen durch eine alternative Berechnung des Stoßquerschnitts umgangen wurde. Unter der Annahme, dass die Komplexe eine sphärische Form aufweisen, konnte das Molekülvolumen mit Hilfe des Kugelvolumens ( $V = 4/3 \cdot \pi \cdot R_p^3$ ) und der allgemeinen Volumenformel ( $V = m / \rho$ ) berechnet werden. Durch Umstellen und Auflösen der beiden Formeln nach dem Radius des Proteins ( $R_p$ ) konnte dieser Ausdruck in Formel (3) eingesetzt werden. Die daraus entstehende Formel (4) bietet eine andere Möglichkeit zur Berechnung des Stoßquerschnitts.

$$\sigma_2 = \pi \left( \sqrt[3]{3m_p / 4\pi \cdot \rho} + R_g \right)^2 \quad (4)$$

Trotzdem konnte auch mit dieser Berechnung nicht gänzlich auf das Volumen der Komplexe verzichtet werden. Der Parameter  $\rho$  in Formel (4) bezieht sich auf eine komplexspezifische Dichte ( $\text{Da} / \text{\AA}^3$ ) und ist daher von der Masse und vom Volumen der Komplexe abhängig. Für globuläre Proteine konnte eine Proteindichte von  $0,84 \text{ g/cm}^3$  angenommen werden [110]. Dieser Wert kam bei der Berechnung der Protein-Ligand-Komplexe sowie für die apo-Proteine zum Einsatz. Für die niedermolekularen, dimeren Peptid-Komplexe wie die VSV-Peptide, die Peptidnukleinsäuren und die Cytochrom b'<sub>559</sub>-Komplexe konnte keine sphärische Form angenommen werden. Für sie wurde eine Dichte von  $0,7 \text{ g/cm}^3$  eingesetzt, wie sie für eine doppelsträngige DNA publiziert wurde [110].

In Tabelle 9 sind die Werte für die Stoßquerschnitte der Protein-Komplexe zusammengefasst, welche mit Hilfe der Formeln (3) und (4) berechnet wurden. Beide Werte variierten im Mittel um 10%, weshalb für die nachfolgende Energieberechnung der Mittelwert der unterschiedlich berechneten Stoßquerschnitte herangezogen wurde.

**Tabelle 9: Berechnete Werte für den Stoßquerschnitt der Protein-Komplexe.**

	pdb	Dimension	$\sigma$ (3) [Å]	$\sigma$ (4) [Å]	Mittelwert [Å]
Cytochrom C	1HRC	36 x 34 x 27	823	728	775
holo-Myoglobin	1WLA	40 x 40 x 38	1217	920	1069
apo-Myoglobin	1WLA	40 x 40 x 38	1217	898	1058
holo- $\alpha$ -Hämoglobin	1bbb	35 x 33 x 28	806	855	831
apo- $\alpha$ -Hämoglobin	1bbb	35 x 33 x 28	806	833	819
holo- $\beta$ -Hämoglobin	1bbb	35 x 33 x 28	806	882	844
apo- $\beta$ -Hämoglobin	1bbb	35 x 33 x 28	806	859	833
Lysozym	2vb1	40 x 33 x 30	928	802	865

Über den Stoßquerschnitt der Komplexe wurde indirekt die Anzahl der in der Kollisionszelle stattfindenden Stöße beeinflusst. Die Berechnung dieser erforderte neben der Kenntnis des Stoßquerschnitts auch die Gasdichte ( $n$ ) in der Kollisionszelle sowie die vom Ion zurückgelegte Wegstrecke ( $l$ ), bevor es fragmentiert wird [111]. Diese Faktoren werden in Formel (5) berücksichtigt, wobei der Parameter  $t'$  der Anzahl der Stöße entspricht.

$$t' = n \cdot l \cdot \sigma \quad (5)$$

Die Gasdichte in der Kollisionszelle ließ sich über Gleichung (6) berechnen [111]. Hierzu wurde der in der Kollisionszelle vorherrschende Druck ( $p$ ), welcher während der Messungen konstant bei  $2 \times 10^{-3}$  mbar gehalten wurde, benötigt. Ebenso wurde das Volumen, welches 1 mol Gas bei Standardtemperatur (298 K) und -druck (1 bar) einnimmt, zur Berechnung herangezogen. Es beträgt  $24'450 \text{ cm}^3$ . Der Parameter  $N_A$  bezieht sich auf die Avogadro Konstante mit einem Wert von  $6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ .

$$n = \frac{N_A \cdot p}{24'450} \quad (6)$$

Die Argon-Gasdichte ( $n$ ) berechnete sich demzufolge zu  $4,93 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2}$ .

Die exakt zurückgelegte Wegstrecke war nicht bekannt und konnte auch nicht ermittelt werden. In der Literatur findet man Angaben darüber, dass die Kollisionen in den letzten 4-5 cm der Kollisionszelle stattfinden [112]. Mit 18,5 cm Kollisionszellenlänge wurde davon ausgegangen, dass ein Molekül eine Wegstrecke von 13,5 cm bis 18,5 cm zurücklegte, bevor es fragmentiert wurde. Die mittlere, zurückgelegte Wegstrecke betrug somit 16 cm, welche für die nachfolgenden Berechnungen eingesetzt wurde. Die berechneten Stoßzahlen sind für die jeweiligen Komplexe dem Anhang zu entnehmen. Für die kovalenten Proteinmoleküle lag die Anzahl im Mittel bei  $69 \pm 8$  Stößen.

Durch die Festlegung der zu normierenden Eigenschaften wie Ladungszustand, Masse und Volumen der Komplexe konnte im Folgenden die Berechnung der Komplexstabilitäten bzw. der Dissoziationsenergien durchgeführt werden.

#### 4.5.3.1 Energieberechnungen für kovalente Bindungsbrüche

Die Normierung der Energie, welche für die Dissoziation der Komplexe erforderlich war, wurde zunächst mit den E50%-Werten der kovalenten Komplexe bzw. Moleküle durchgeführt. Zur Fragmentierung kovalenter Bindungen sollten unabhängig vom verwendeten System ähnliche Dissoziationsenergien nachweisbar sein. Die Bindungsenergie kovalenter Bindungen beträgt in der Flüssig-Phase je nach Art der Bindung etwa -80 kcal/mol [113]. Die Bindungsenthalpie der labilsten Bindung, welche in den verwendeten Proteinen vorkommt, entspricht der C-S Bindung mit -62 kcal/mol, wie sie in einem Methioninrest enthalten ist. Die nächst stärkeren Bindungen C-N, C-C, C-O sowie C-H besitzen eine maximale Bindungsenthalpie von -100 kcal/mol [113]. Die Stabilitäten der kovalenten Bindungen sollten sich in der Gas-Phase nicht verändern, weshalb die Dissoziationsenergien in einem ähnlichen Bereich liegen müssten. Da zur Dissoziation bzw. Spaltung von Bindungen Energie aufgewandt werden muss, ändert sich das Vorzeichen der Energiewerte.

In der klassischen Physik werden inelastische Stöße eines Zweiteilchensystems, von denen sich beide in Bewegung befinden, einfacher im Schwerpunktsystem beschrieben (*center-of-mass* – *com*). Anders als im Laborsystem (*lab*), in welchem beide Teilchen ihre eigene Position und Geschwindigkeit besitzen, wird im Schwerpunktsystem ein Teilchen als statisch angenommen. Der Massenschwerpunkt wird daher als Nullpunkt definiert. Der im Laborsystem bestimmte E50%-Wert ( $z \times E50\%$ ) wurde zu Beginn unter Einbeziehung der Massen mit Gleichung (7) in den  $E_{com}$ -Wert umgerechnet [52, 114].

$$E_{com} = \frac{m_g}{m_p + m_g} E_{lab} = \frac{m_g}{m_p + m_g} z \cdot E50\% \quad (7)$$

Während jedes einzelnen Stoßes kann diese Energie in innere Energie umgewandelt werden. Die gesamte Erhöhung der inneren Energie nach allen Kollisionen kann dann über Gleichung (8) berechnet werden.

$$\Delta E_{int} = \phi \cdot E_{com} \frac{m_p}{m_g} \frac{1}{C_D} \left(1 - \exp\left(-\frac{C_D m_g t'}{m_p}\right)\right) \quad (8)$$

Der Faktor  $\phi$  bezieht sich dabei auf die Transfereffizienz von kinetischer in innere Energie [54]. Die Effizienz des Energietransfers ist unbekannt, weshalb zunächst angenommen wurde, dass 100%

der kinetischen Energie in innere Energie umgewandelt werden, auch wenn dies gemäß dem Impulserhaltungssatz einen Stillstand der beteiligten Moleküle zur Folge hätte. Eine vollständige Energieübertragung entspricht einem Faktor von  $\Phi = 1$ . In der Literatur wurde dieser Wert zumindest für große Ionen postuliert [54, 75]. Eine weitere, unbekannte Größe stellte der Widerstandsbeiwert ( $C_D$ ) dar. Dieser Wert beschreibt die aerodynamische Kraft, welche auf ein Teilchen wirkt, wenn es eine Flüssigkeit durchquert. Für die Bedingungen während einer CID-Messung wurden Widerstandsbeiwerte gemäß Chen *et al.* berechnet (Berechnung siehe Anhang) [115].

Die kalkulierten Energieunterschiede sind für die jeweiligen, kovalenten Proteine in Tabelle 10 zusammengefasst. Die Energiewerte lagen im Bereich von 1'375,0-1'759,6 kcal/mol und damit um einen Faktor von etwa 20 höher als die aus der Flüssig-Phase bekannten Bindungsenergien. Ein Stabilitätsgewinn für kovalente Bindungen wurde in der Gas-Phase nicht erwartet, weshalb die maximale Transfereffizienz angepasst wurde. Unter der Annahme, dass lediglich 5% der kinetischen Energie in innere Energie umgewandelt werden, lagen die Bindungsenergien bei  $75 \pm 8$  kcal/mol und damit in einem realistischen Energiebereich für kovalente Bindungen.

**Tabelle 10: Berechnete Energiewerte für kovalente Bindungsbrüche unter Einbeziehung multipler Stöße.**

	$\Delta E_{int}$ [kcal/mol]	5%
Cytochrom C	1'413,1	70,7
apo-Myoglobin	1'759,6	88,0
apo- $\alpha$ -Hämoglobin	1'411,0	70,5
apo- $\beta$ -Hämoglobin	1'375,0	68,7
Lysozym	1'573,2	78,7

Die Anpassung der Transfereffizienz ermöglichte die Ermittlung von Gas-Phasen-Stabilitätswerten für kovalente Bindungen, welche den Bindungsenergien aus Flüssig-Phasen-Untersuchungen glichen. Die in der Energienormierung getroffenen Annahmen und Näherungen, wie die vom Ion zurückgelegte Wegstrecke oder die Bestimmung des Proteinvolumens, beeinflussten im Wesentlichen die Anzahl der Stöße zwischen dem Vorläuferion und den Gasmolekülen. Unter der Annahme, dass ein einziger Stoß zur Fragmentierung ausreicht, konnten die eingeführten Näherungen vernachlässigt und die Stoßanzahl auf 1 reduziert werden. Diese Vereinfachung ermöglichte eine neue, alternative Energieberechnung, welche ebenfalls mit Formel (8) durchgeführt wurde. Für den Transfer von kinetischer in innere Energie wurde zunächst wieder ein Transfereffizienzfaktor von 1 angenommen. In Tabelle 11 sind die normierten Energiewerte, die zur Fragmentierung kovalenter Bindungen erforderlich waren, zusammengestellt.

**Tabelle 11: Berechnete Energiewerte für kovalente Bindungsbrüche unter Einbeziehung eines effektiven Stoßes.**

	$\Delta E_{\text{int}}$ [kcal/mol]
Cytochrom C	28,4
apo-Myoglobin	27,9
apo- $\alpha$ -Hämoglobin	26,1
apo- $\beta$ -Hämoglobin	24,9
Lysozym	28,1

Die berechneten Energiewerte lagen im Mittel für einen kovalenten Bindungsbruch bei  $27,1 \pm 1,5$  kcal/mol. Für die Dissoziation kovalenter Bindungen war diese Energie, obwohl sie für alle kovalenten Moleküle ähnlich war, zu gering. Dies konnte nicht mit Hilfe des Effizienzfaktors reguliert werden, da ohnehin eine Transfereffizienz von 100% postuliert wurde. Die Ein-Stoß-Energieberechnung war deshalb für die Fragmentierung der kovalenten Bindungen nicht anwendbar.

#### 4.5.3.2 Energieberechnung für nichtkovalente Bindungsbrüche

Die mit Hilfe der kovalenten Bindungsbrüche normierten Energieberechnungen wurden anschließend auf die E50%-Werte der nichtkovalenten Komplexe angewandt und deren Gas-Phasen-Stabilitäten ermittelt. Zunächst erfolgte die Energiekalkulation mit Gleichung (8) unter der Einwirkung multipler Stöße. Die berechneten Stoßanzahlen für die einzelnen Komplexe sind dem Anhang zu entnehmen. Wie für die Berechnung der kovalenten Komplexe eingeführt, wurde eine Transfereffizienz von 5% angenommen. Die berechneten Energien sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

**Tabelle 12: Berechnete Energiewerte für nichtkovalente Komplexe unter Einbeziehung multipler Stöße.**

	5% $\Delta E_{\text{int}}$ [kcal/mol]
Myoglobin	57,2
$\alpha$ -Hämoglobin	30,4
$\beta$ -Hämoglobin	40,9
Glykophorin A-Dimer	11,1
ACGT-Dimer	10,6
Cyt b' <sub>559</sub> -Dimer	16,6



Während die berechneten Dissoziationsenergien der kovalenten Bindungen um maximal 11% untereinander variierten, zeigten sich bei den nichtkovalenten Komplexdissoziationen größere Unterschiede. Die Dissoziationsenergien lagen für die Peptid-Komplexe bis 6'000 Da im Bereich von 10,6-16,6 kcal/mol und für die untersuchten Hämprotein-Komplexe im Bereich von 30,4-57,2 kcal/mol. Die große Varianz innerhalb der nichtkovalenten Systeme konnte auf unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen den Peptiden bzw. den Proteinen und Liganden zurückgeführt werden.

Neben der Dissoziation durch multiple Stöße wurde auch die Ein-Stoß-Energieberechnung auf die nichtkovalenten Komplexe angewandt (Tabelle 13).

**Tabelle 13: Berechnete Energiewerte für nichtkovalente Komplexe unter Berücksichtigung eines effektiven Stoßes.**

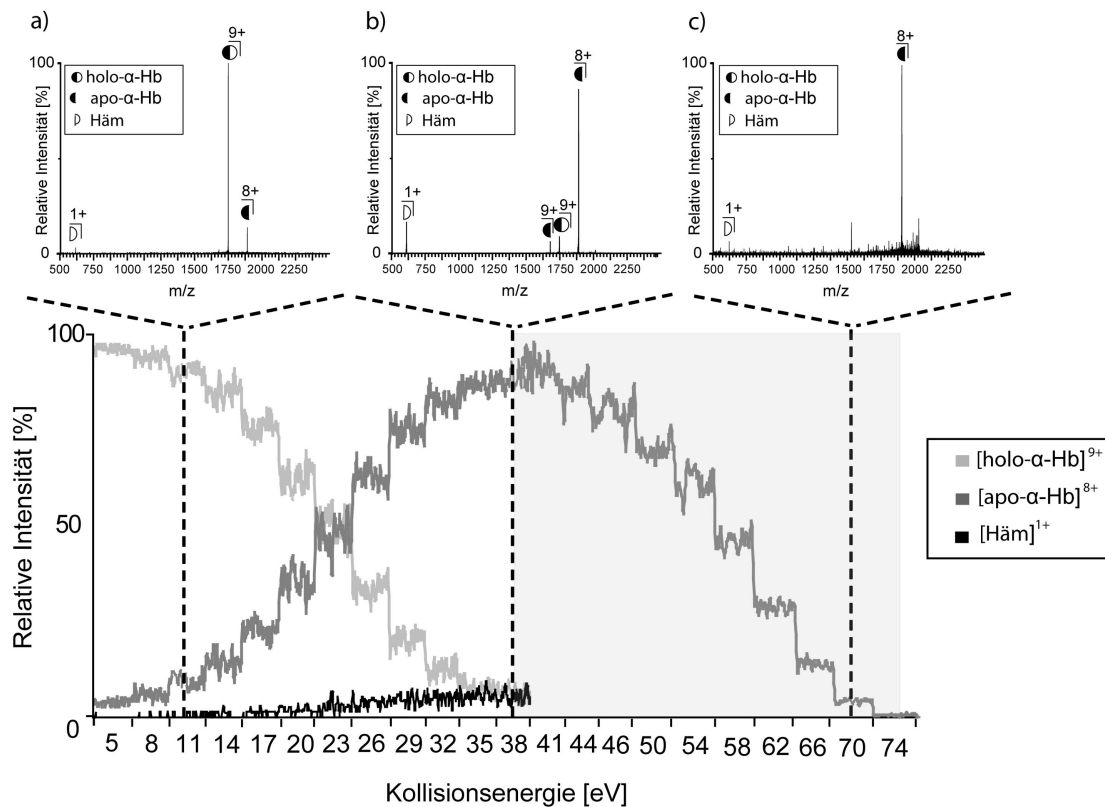
	$\Delta E_{\text{int}}$ [kcal/mol]
Myoglobin	16,7
$\alpha$ -Hämoglobin	11,2
$\beta$ -Hämoglobin	14,7
Glykophorin A-Dimer	9,1
ACGT-Dimer	12,1
Cyt b <sub>559</sub> '-Dimer	9,8

Die berechneten Dissoziationsenergien zeigten ebenfalls eine große Varianz beim Vergleich der verschiedenen Komplexsysteme. Die höchste Dissoziationsenergie wurde ähnlich wie bei der Energieberechnung mit multiplen Stößen für das holo-Myoglobin bestimmt. Trotzdem variierten die Energiewerte, welche mit den unterschiedlichen Normierungen bestimmt wurden, enorm. Ein Vergleich mit Literaturenergiewerten zeigte eine bessere Übereinstimmung für die Energiewerte, welche unter Verwendung der Ein-Stoß-Energieberechnung ermittelt wurden.

Die Normierung der E50%-Werte auf Komplexeigenschaften wie Masse und Ladungszustand ermöglichte die Berechnung der Dissoziationsenergien. Durch diese Berechnung konnten verschiedene Systeme miteinander und mit Literaturwerten verglichen werden. Es zeigte sich, dass mit der Ein-Stoß-Energieberechnung Dissoziationsenergien für nichtkovalente Komplexe ermittelt werden konnten, welche den Bindungsenergien der Flüssig-Phase glichen. Unter Berücksichtigung multipler Stöße waren die Energien der nichtkovalenten Komplexe trotz Anpassung der Transfereffizienz zu hoch. Zur Berechnung der Dissoziationsenergien der kovalenten Komplexe schien jedoch die Multi-Stoß-Berechnung geeigneter zu sein.

#### 4.5.4 Fragmentierungsmuster

CID-Messungen bieten neben der Bestimmung von Stabilitäten die Möglichkeit, die entstehenden Fragmente zu beobachten. Auch anhand dieser können Komplexe eingehend charakterisiert und wichtige Eigenschaften der Systeme massenspektrometrisch analysiert werden. So bestätigten diese Messungen, dass durch die Hämfreisetzung aus einem holo-Protein nichtkovalente Wechselwirkungen geschwächt, bei der Fragmentierung der apo-Proteine hingegen kovalente Bindungen gebrochen wurden. Dies soll am Beispiel des  $\alpha$ -Hämoglobin-Komplexes verdeutlicht werden (Abb. 66). Die Dissoziation des 9-fach geladenen Komplexes kann einerseits durch das CID-Profil bzw. das Chromatogramm des Komplexes wiedergegeben werden. Andererseits zeigen die Einzelspektren zu unterschiedlichen Zeitpunkten bzw. Kollisionsenergien die genaue Zusammensetzung der Probe an.



**Abb. 66: CID-Profil eines 9-fach geladenen holo- $\alpha$ -Hämoglobins.** Simultan mit der Dissoziation des Komplexes können die entstehenden Fragmente nachgewiesen werden. Sie können zum Einen in Form ihrer Chromatogramme (EICs), zum Anderen in den Produktspektren (a bis c) beobachtet werden. In den EICs der Produkte sieht man, dass auch die gebildeten Fragmente (hier apo-Hämoglobin) durch weitere Erhöhung der Kollisionsspannung fragmentiert werden können. Anhand des Produktspektrums (c) kann durch das Entstehen der vielen Signale im unteren m/z-Bereich die Fragmentierung verschiedener, kovalenter Bindungen wahrgenommen werden. Der grau hinterlegte Bereich wurde in einer separaten Messung durchgeführt.

Bei kleinen Kollisionsenergien von 11 eV (Detaildarstellung Abb. 66 a) konnte als höchstes Signal der zu dissoziierende 9-fach geladene Komplex detektiert werden. Je höher die Kollisionsenergie, desto geringer wurde das Signal des Komplexes, während andere Signale – die der entstehenden

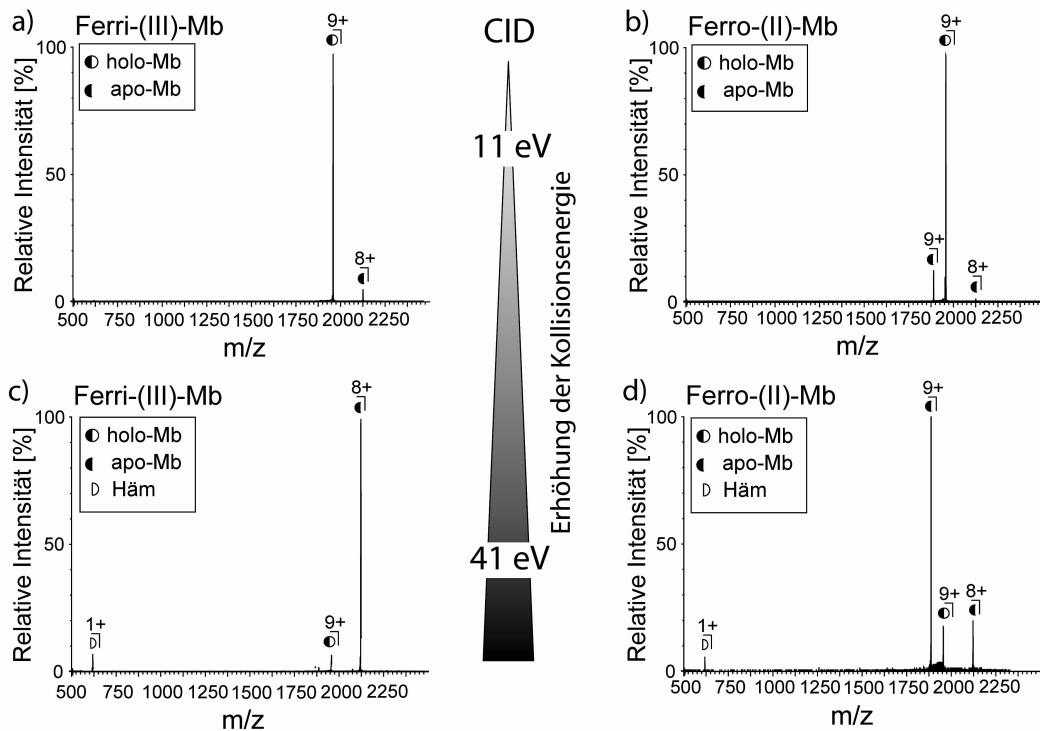
Fragmente – detektiert werden konnten (Detaildarstellung Abb. 66 b). Aus dem 9-fach geladenen holo-Hämoglobin entstand bei 38 eV das 8-fach geladene apo-Hämoglobin und 1-fach geladenes Häm. Außerdem konnten geringe Mengen an 9-fach geladenem apo-Hämoglobin detektiert werden. Erhöhte man anschließend die Kollisionsenergie (hier in einer separaten Messung durchgeführt), so konnte auch das apo-Hämoglobin fragmentiert werden. In der Detaildarstellung der Abb. 66 c konnten dann im unteren m/z-Bereich viele Signale wahrgenommen werden, welche die Fragmentierung von kovalenten Bindungen bestätigten.

Die Betrachtung der entstehenden Fragmente liefert somit weitere wichtige Ergebnisse, welche anhand der CID-Profile nicht erhalten werden können. Im Folgenden wird deshalb diese Methodik verwendet, um die verschiedenen holo-Myoglobin-Komplexe und die Peptidnukleinsäuren genauer zu studieren.

#### 4.5.4.1 *Unterschiedliche holo-Myoglobinformen*

Der holo-Myoglobin-Komplex kann in Abhängigkeit von der Oxidationszahl des zentralen Eisenatoms in zwei verschiedenen Formen existieren. In der Ferro-(II)-Form ist ein  $\text{Fe}^{2+}$ -Ion, in der Ferri-(III)-Form ein  $\text{Fe}^{3+}$ -Ion im Porphyrinring koordinativ gebunden. Die verschiedenen Formen konnten im Massenspektrum einer einfachen MS-Messung nicht voneinander unterschieden werden. Die ermittelten E50%-Werte der verschiedenen Komplexe zeigten unterschiedliche Stabilitäten für beide Myoglobinformen (vgl. Abb. 62). Auch die Produktspektren erlaubten bei höheren Kollisionsenergien eine Unterscheidung der beiden holo-Myoglobin-Komplexe (Abb. 67 c und d).

Bei kleinen Kollisionsenergien von 11 eV waren die Produktspektren der beiden Myoglobinproben nahezu identisch (Abb. 67 a und b). Es wurde hauptsächlich das zu fragmentierende, 9-fach geladene holo-Myoglobin detektiert. Seine Dissoziation wurde durch die Erhöhung der Kollisionsenergie eingeleitet. Bei einer Kollisionsenergie von 41 eV waren nur noch Fragmente detektierbar, da der Komplex nahezu vollständig dissoziiert wurde. Das 9-fach geladene Ferri-(III)-Myoglobin wurde überwiegend zu 8-fach geladenem apo-Myoglobin und 1-fach geladenem Häm gespalten, während der 9-fach geladene Ferro-(II)-Komplex hauptsächlich zu 9-fach geladenem apo-Myoglobin und ungeladenem, nicht detektierbarem Häm fragmentiert wurde. Die Entstehung unterschiedlicher Fragmente konnte durch die Reduktion des Eisenatoms – ausgelöst durch die Zugabe des Dithiothreitol – erklärt werden (siehe Kapitel 1.1.3.3).



**Abb. 67: Produktspektren der Dissoziation von Ferri-(III)-Myoglobin im Vergleich zu Ferro-(II)-Myoglobin bei unterschiedlichen Kollisionsenergien.** a und c: Durch die Dissoziation von Ferri-(III)-Myoglobin entsteht bei hohen Kollisionsenergien 8-fach geladenes apo-Myoglobin und 1-fach geladenes Häm. b und d: Durch die Dissoziation von Ferro-(II)-Myoglobin entsteht 9-fach geladenes apo-Myoglobin und eine nicht detektierbare, ungeladene Hämgruppe.

Die verringerte Stabilität des Ferro-(II)-Myoglobins könnte auf den Verlust einer Ladung zurückzuführen sein. Die einzige bekannte, ionische Interaktion zwischen der Hämgruppe und der Polypeptidkette ist eine Salzbrücke zwischen Lysin-45 und den Propiongruppen des Porphyrinrings [116, 117]. Diese Interaktion ist jedoch nicht von der Ladung des Eisenatoms abhängig. Die Stärke von ionischen Wechselwirkungen hängt jedoch vom Abstand der beiden Interaktionspartner zueinander ab. Würde die Proteinstruktur durch die Zugabe von DTT entfaltet, so ginge dies mit einer Verringerung der Stabilität einher. Das MS-Spektrum einer mit DTT versetzten Probe ließ aufgrund der breiten Ladungsverteilung des apo-Myoglobins eine Entfaltung der Proteinstruktur vermuten. Die Signalverteilung des apo-Myoglobins war außerdem vergleichbar mit der einer 40%igen TFE-Lösung. Für holo-Myoglobin-Komplexe dieser Lösung konnte die teilentfaltete Struktur bereits anhand eines verringerten E50%-Wertes (29 eV) nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.5.2.2). Das Ferro-(II)-Myoglobin wies einen nahezu identischen E50%-Wert von 28 eV auf, weshalb auch in dieser Lösung eine teilentfaltete Struktur des Myoglobin-Komplexes vorliegen könnte.

#### 4.5.4.2 Peptidnukleinsäuren

Eine Auffälligkeit im Fragmentierungsmuster bei der Dissoziation bestimmter PNA-Dimere ermöglichte auch im Falle der Peptidnukleinsäuren eine nähere Charakterisierung dieser anhand der CID-Produktspektren. Unabhängig von der Anzahl der möglichen Wasserstoffbrückenbindungen konnten für die nachfolgenden PNA-Kombinationen 3-fach geladene Hetero-Dimere beobachtet werden: ACTA+TAGT (1), ACTA+TGAT (2), ATCA+TAGT (6) und ATCA+TGAT (7) (vgl. Abb. 32 und Abb. 33). Die Stabilitäten dieser Hetero-Dimere wurden durch nahezu gleiche E50%-Werte als ähnlich angenommen. Ihre Dissoziation verlief hinsichtlich der entstehenden Fragmente allerdings unterschiedlich. Bei der Dissoziation von (1) entstanden die beiden 2-fach geladenen Monomere im Verhältnis 1:1 (Abb. 68 a). Dies konnte ebenfalls bei der Dissoziation von (2) beobachtet werden.

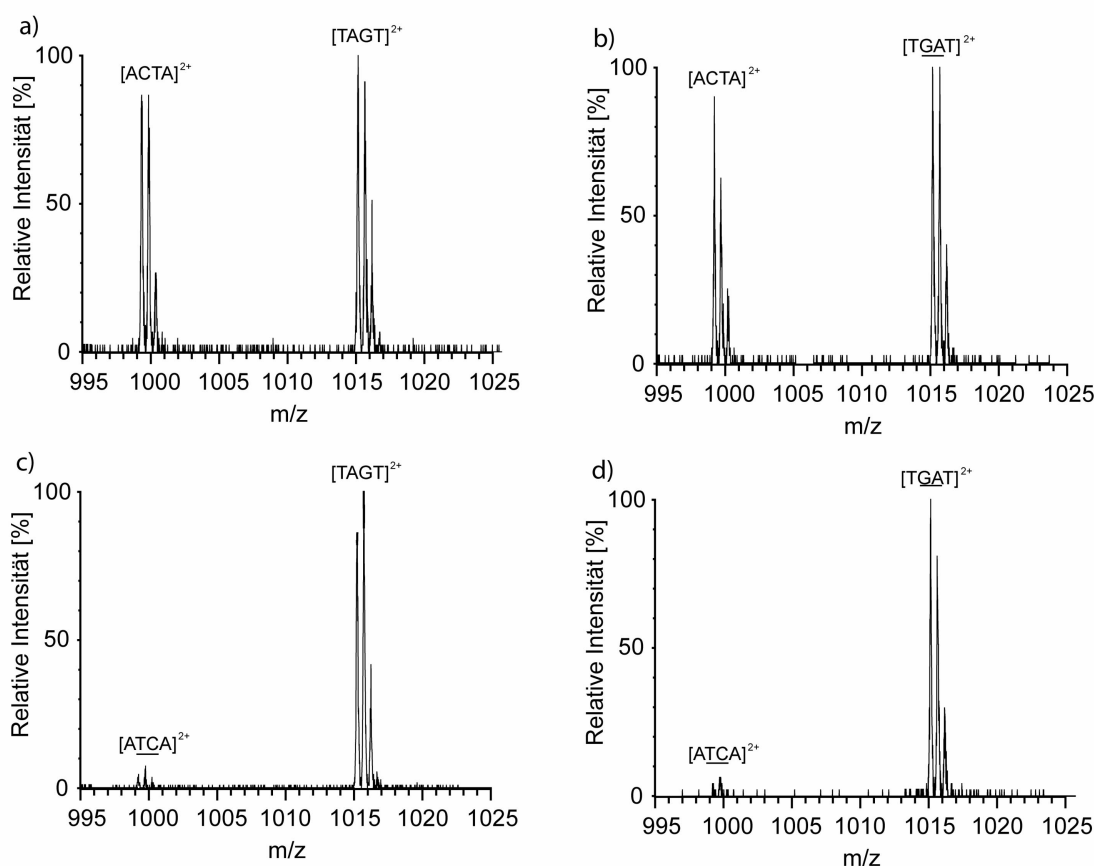


Abb. 68: Produktspektren ( $m/z$ -Bereich 995-1'025) verschiedener PNA-Hetero-Dimere bei einer Kollisionsspannung von 41 eV.

Die Hetero-Dimere (6) und (7) wiesen ein anderes Dissoziationsverhalten auf. Als Hauptfragmente wurden die 2-fach geladenen TAGT- bzw. TGAT-Monomere detektiert (Abb. 68 c und d). In diesen Hetero-Dimeren war als zweites PNA das ATCA-Monomer enthalten, welches in den Produktspektren nur zu einem geringen Prozentsatz wahrgenommen werden konnte. Das

spiegelbildlich aufgebaute ACTA hingegen konnte in Kombination eines TAGT- oder TGAT-Monomers in den CID-Messungen in hoher Intensität als 2-fach geladenes Monomer detektiert werden (Abb. 68 a und b).

Eine Erklärung für die ungleiche Protonenaufteilung nach der Dissoziation könnte auf unterschiedliche Basizitäten bzw. Protonenaffinitäten der Peptidnukleinsäuren zurückgeführt werden. Die Basizitäten von ACTA und TAGT im Komplex (1) müssten aufgrund der sich im 1:1-Verhältnis bildenden, 2-fach geladenen Monomere ähnlich sein. Gleiches gilt für ACTA und TGAT im Komplex (2). Lediglich ATCA müsste eine geringere Basizität als die anderen verwendeten PNAs aufweisen.

Aus der Literatur ist folgende Reihenfolge der Nukleinbasen-Basizitäten bekannt:  $G > C > A \gg T$  [118]. Eine ausreichende Erklärung für die unterschiedlichen Fragmentierungsmuster liefern diese allerdings nicht. Insbesondere weil die Peptidnukleinsäuren ACTA und ATCA aus den gleichen Nukleinbasen aufgebaut sind und sich ihre Basizitäten aus diesem Grund nicht unterscheiden sollten. Der einzige Unterschied zwischen ACTA und ATCA ist die Reihenfolge der Nukleinbasen. Folglich spielt neben der Art der Nukleinbase auch deren Position im Helixstrang eine entscheidende Rolle. Um die Peptidnukleinsäuren gemäß ihrer Gas-Phasen-Basizitäten in verschiedene Gruppen einordnen zu können, wurden die Fragmentierungsmuster aller zur Verfügung stehenden Hetero-Dimere untersucht. Eine mögliche Basizitätseinteilung, die sich aus dem Fragmentierungsmuster der 8 verwendeten Hetero-Dimere-Systeme ergibt, ist in Tabelle 14 zu finden.

**Tabelle 14: Mögliche Einordnung der Gas-Phasen-Basizitäten der Peptidnukleinsäuren anhand ihrer Fragmentierungsmuster.**

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
(1) TAGT = ACTA (50:50)	(2) <u>TGAT</u> > ACTA (66:33) (3) ACGT > TAGT (66:33) (4) ACGT > <u>TGAT</u> (66:33) (5) ACGT > ACTA (75:25)	(6) TAGT >> <u>ATCA</u> (90:10) (7) <u>TGAT</u> >> <u>ATCA</u> (90:10) (8) ACGT >> <u>ATCA</u> (90:10)
keine Unterschiede	geringe Unterschiede	große Unterschiede
G (C-term) = C (N-term)	1. G (N-term) > C (N-term) 2. C + G > G > C	G (N/C-term) >> C (C-term)

Insgesamt wurden drei Fragmentierungsgruppen aufgestellt. Die Gruppe 1 umfasst Hetero-Dimere, welche aus Monomeren gleicher Basizität aufgebaut sind, weshalb durch die Dissoziation 2-fach geladene Monomere im Verhältnis 1:1 entstehen. Gruppe 2 beinhaltet Hetero-Dimere, welche aus Monomeren unterschiedlicher Basizität bestehen. Das Verhältnis der entstehenden Fragmente

beträgt entweder 2:1 oder 3:1, worauf ein geringer Unterschied in der Basizität zurückgeführt werden kann. In der Gruppe 3 sind Hetero-Dimere zu finden, deren Peptidnukleinsäuren einen großen Basizitätsunterschied aufweisen. Dieser wird durch ein Fragmenteverhältnis von 9:1 verdeutlicht. Anhand dieser Eingruppierung konnten basizitätsbestimmende Faktoren ermittelt werden. Guanin und Cytosin weisen in DNA-Molekülen die höchste Basizität auf. Das Guanin ist dabei protonenaffiner als das Cytosin. Dies konnte anhand des Fragmentierungsmusters von Dimer (2) für die Peptidnukleinsäuren bestätigt werden. Das in der Sequenz des TGAT enthaltene Guanin bestimmte die Gesamtbasizität dieses Peptids. Das ACTA enthält ein Cytosin, was die Basizität dieses Monomers maßgeblich beeinflusste. Das TGAT-Monomer ist gemäß dem Fragmentierungsmuster protonenaffiner als das ACTA-Monomer, was durch die Anwesenheit des Guanins beeinflusst wurde. Guanin ist somit auch in einer Peptidnukleinsäuresequenz protonenaffiner als Cytosin. Im Dimer (2) sind sowohl Guanin als auch Cytosin am N-terminalen Ende der Sequenz positioniert. Trägt die Position der Nukleinbasen nicht zur Gesamtbasizität bei, so müsste auch das Dimer (1) in Gruppe 2 zu finden sein. In dem darin enthaltenen Monomer TAGT ist Guanin näher am C-Terminus lokalisiert, was die Basizität des TAGT-Monomers gegenüber dem spiegelbildlichen TGAT herabsetzt. Ein Guanin nahe dem C-terminalen Ende besitzt folglich eine geringere Basizität als eines nahe dem N-Terminus. Die Position der Nukleinbasen trägt daher ebenfalls zur Basizität der PNAs bei.

Die anderen, in Gruppe 2 eingeordneten PNAs werden alle von der Basizität des ACGT-Monomers bestimmt. Diesem Monomer kommt mit einem Guanin und einem Cytosin eine höhere Basizität zu, als wenn nur eine dieser Nukleinbasen in der Sequenz enthalten wäre. Dies kann durch einen synergetischen Effekt der Einzelbasizitäten erklärt werden. Gleiches gilt für das in Gruppe 3 eingeordnete Dimer (8). Allerdings kommt hier zusätzlich noch die Position des Cytosins zum Tragen – Cytosin ist im ATCA näher am C-Terminus lokalisiert, was ein ungünstiges Resultat auf die Gesamtbasizität bewirkt. Ein Monomerverhältnis von 9:1 ist die Folge.

Zusammenfassend können folgende Regeln zur Verifizierung der Gas-Phasen-Basizitäten für Peptidnukleinsäuren aufgestellt werden:

1. Guanin ist protonenaffiner als Cytosin ( $G > C$ )
2. Einzelbasizitäten wirken synergetisch ( $G + C > G > C$ )
3. N-terminales Guanin oder Cytosin ist protonenaffiner als C-Terminales

## 5 Diskussion

Die enorme Bedeutung von Peptid- bzw. Protein-Komplexen in biologischen Prozessen rechtfertigt das seit Jahrzehnten anhaltende Forschungsinteresse an diesen Molekülen. Unzählige, verschiedene Methoden können für ihre Untersuchung herangezogen werden. Viele dieser Methoden sind zeitintensiv oder erlauben lediglich die Charakterisierung der Probe als Gesamteinheit, nicht jedoch einzelner, in der Lösung enthaltener Komponenten. Massenspektrometrische Analysen liefern aufgrund der kurzen Messdauer sowie der relativ einfachen Gerätehandhabung eine alternative Charakterisierungsmethode, mit der alle in einer Probe enthaltenen Substanzen simultan detektiert und anschließend einzeln analysiert werden können.

### 5.1 Sequenzabhängige Oligomerisierung

Bei der Charakterisierung der Komplexe wurde der Einfluss der Aminosäuresequenz auf die Komplexbildung durchleuchtet. In Abhängigkeit der Primärstruktur können die Interaktionspartner unterschiedliche Wechselwirkungen ausbilden, wodurch die Oligomerisierung beeinflusst wird.

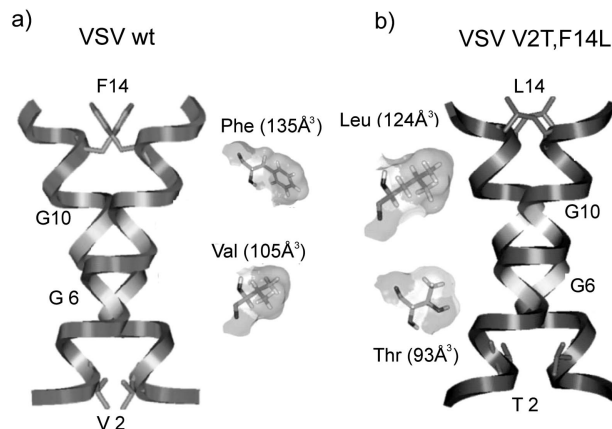
#### 5.1.1 GxxxG-Motiv – Oligomerisierungsmotiv hydrophober Peptide

Spezielle Abfolgen in der Aminosäuresequenz, wie z. B. das GxxxG-Motiv, können die Oligomerisierung von Peptiden unterstützen [13, 119]. Für Glykophorin A, eines der meist untersuchten Peptide hinsichtlich der Interaktion zweier Helices, wurde die Bedeutung des Motivs in der Flüssig-Phase sowie *in vivo* bereits charakterisiert. Auch in der Wildtypsequenz des *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV) ist dieses Oligomerisierungsmotiv enthalten. Die massenspektrometrischen Analysen bestätigten für das VSV wt-Peptid eine hohe Oligomerisierung, welche mit der des Glykophorins vergleichbar war (vgl. Abb. 26). Auch die untersuchten VSV-Mutanten wiesen ein ähnliches Oligomerisierungsverhalten auf, obwohl die Glycinreste zu Alanin mutiert wurden.

Die Bedeutung des Oligomerisierungsmotivs verdeutlicht die Flüssig-Phasen-NMR-Struktur des Glykophorins [15]. Beide Glycinreste positionieren sich in der Kontaktfläche der interagierenden Helices und begünstigen aufgrund der Eigenschaften des Glycins die Oligomerisierung. Der VSV-Wildtyp verfügt ebenfalls über ein GxxxG-Motiv, dessen Einfluss in Abb. 69 a verdeutlicht wird. Da Glycin über keine Seitenketten verfügt, findet eine optimale Annäherung der beiden Helices statt. Dabei bildet sich zwischen den beiden Helices eine enge und stabile Packung aus. Statt



voluminösen Seitenketten besitzt das Glycin zwei  $C_{\alpha}$ -H-Atome, welche die dimere Struktur über  $C_{\alpha}$ -H...O Wasserstoffbrücken stabilisieren können [87, 120, 121]. Aufgrund der fehlenden Seitenketten wird weiterhin der Entropieverlust, der bei der Oligomerisierung zweier Helices entsteht, gering gehalten [122]. Diese Vorteile begünstigen die Oligomerisierung von Helices mit GxxxG-Motiv, wie zum Beispiel die des VSV-Wildtyps.



**Abb. 69 a und b: Schematische Darstellung des VSV wt- und des VSV V2T,F14L-Homo-Dimers.** Durch die in der Mutante ausgetauschten Aminosäuren werden sterische Behinderungen, welche die Zusammenlagerung der Helices stören könnten, umgangen. Weiterhin könnte Threonin für eine zusätzliche Stabilisierung über die polare Hydroxyl-Seitenkette sorgen, über welche eine intermolekulare Wasserstoffbrücke zu einer anderen Helix ausgebildet werden kann. Abbildung verändert nach [18].

In den hier verwendeten VSV-Mutanten wurden entweder beide, oder eines der beiden Glycinreste zu Alanin mutiert. Alanin ist ebenfalls eine kleine Aminosäure, deren Struktur sich von der des Glycins nur in einer Methylgruppe unterscheidet. Ihr van-der-Waals-Volumen ist lediglich um  $19 \text{ \AA}^3$  größer als das Volumen des Glycins. Dies ermöglichte auch nach dem Austausch der Aminosäuren die Ausbildung einer kompakten, dimeren Struktur. Der Entropieverlust, der durch die Oligomerisierung entsteht, ist aufgrund der kleinen Seitenkette des Alanins ebenfalls gering [123]. Diese Ähnlichkeiten zwischen Glycin und Alanin könnten dafür verantwortlich sein, dass ein AxxxA-Motiv die Oligomerisierung in einer vergleichenden Weise begünstigt wie ein GxxxG-Motiv. Ein ähnliches Oligomerisierungsverhalten aller hier untersuchten VSV-Peptide wäre die Folge, wie es mit Hilfe der massenspektrometrischen Untersuchungen aufgezeigt wurde.

In obiger Abbildung wird außerdem deutlich, dass weitere Aminosäuren der Interaktionsfläche das Oligomerisierungsverhalten beeinträchtigen können. Phenylalanin in Position 14 verfügt wegen des aromatischen Ringsystems über eine sehr große Seitenkette, welche die Annäherung der Helices behindern kann. Mit einem van-der-Waals-Volumen von  $135 \text{ \AA}^3$  ist Phenylalanin eine der größten Aminosäuren und ist daher durch eine Kleinere, wie zum Beispiel Leucin, ersetzbar. Dieser Austausch wurde mit der VSV-Mutante VSV V2T,F14L eingeführt. Zusätzlich wurde eine andere Aminosäure der Interaktionsfläche von Valin zu Threonin mutiert (Abb. 69 b). Die erhaltene Doppelmutante zeigte in den massenspektrometrischen Analysen einen, gegenüber dem VSV wt

leicht erhöhten Oligomerisierungsanteil (vgl. Abb. 26). Das veränderte Oligomerisierungsverhalten ist zum Einen auf den Austausch der sterisch großen und dadurch ungünstigen Seitenkette des Phe-14 zurückzuführen, zum Anderen auf die Einführung der polaren Seitenkette des Thr-2. Threonin verfügt über eine Hydroxylgruppe, welche die Oligomere über eine intermolekulare Wasserstoffbrücke stabilisieren kann. Glykophorin A beinhaltet in seinem 7-Aminosäuresequenzmotiv ebenfalls ein Threonin in der Interaktionsfläche der beiden Helices. Diese Aminosäure bildet über seine Hydroxylgruppe, wie mit Festkörper-NMR-Untersuchungen (REDOR – *rotational echo double resonance*) bestätigt wurde, eine Wasserstoffbrücke zum Val-84 der zweiten Helix aus [24]. Die dadurch auftretende Stabilisierung des Dimers begünstigt die Ausbildung der Homo-Oligomere, was den erhöhten Dimeranteil der VSV-Mutante gegenüber dem VSV wt erklärt.

Einen ähnlichen Anstieg im Oligomerisierungsverhalten war auch für das von Melnyk *et al.* untersuchte *Major Coat Protein* (MCP) des Bakteriophagen M13 durch die eingebaute Sequenzabfolge LxxxGxxxGxxxT zu beobachten [18]. Dieses Protein besitzt, obwohl in der Wildtypsequenz ein GxxxG-Motiv enthalten ist, lediglich eine geringe Neigung, Oligomere auszubilden. Die Erweiterung des Oligomerisierungsmotivs hatte, ähnlich wie bei der hier untersuchten VSV-Mutante (VSV V2T,F14L), eine Steigerung des Dimeranteils um ein Vielfaches zur Folge.

Die AxxxA- bzw. GxxxG-abhängige Oligomerisierung wurde in den letzten Jahren mit unterschiedlichsten Techniken eingehend studiert. Abhängig von der verwendeten Technik konnten Unterschiede zwischen beiden Motiven wahrgenommen werden. Fleming *et al.* detektierten 2004 über Analytische Ultrazentrifugation für Alaninmutanten des Glykophorins ebenfalls hohe Dimeranteile. Die Forschungsgruppe kam deshalb zu dem Schluss, dass ein GxxxG-Motiv weder eine notwendige noch eine hinreichende Voraussetzung zur Oligomerisierung darstellt [25, 26]. Andererseits zeigten Lemmon *et al.* starke Oligomerisierungsverluste bei einem Austausch des Gly-83 zu Alanin [124]. Dies wurde von Langosch *et al.* mit dem ToxR-System *in vivo* sowohl für das Glykophorin A als auch für die VSV-Peptide bestätigt [16, 30].

Die massenspektrometrischen Analysen bestätigten die Ergebnisse, wie sie aus den Flüssig-Phasen Untersuchungen, z. B. der Analytischen Ultrazentrifugation, bekannt waren. Da sich massenspektrometrisch keine Unterschiede in der Oligomerisierung von Peptiden mit GxxxG- oder AxxxA-Motiv nachweisen ließen, könnte statt des GxxxG-Motivs ein [Sm]xxx[Sm]-Motiv (Sm = *small*) für die Steuerung der Zusammenlagerung verantwortlich sein. Die gegenüber den VSV-Peptiden vernachlässigbare Oligomerisierung des A16 bestätigte zudem die Möglichkeit, sequenzabhängige Oligomerisierungen in der Gas-Phase nachzuweisen.

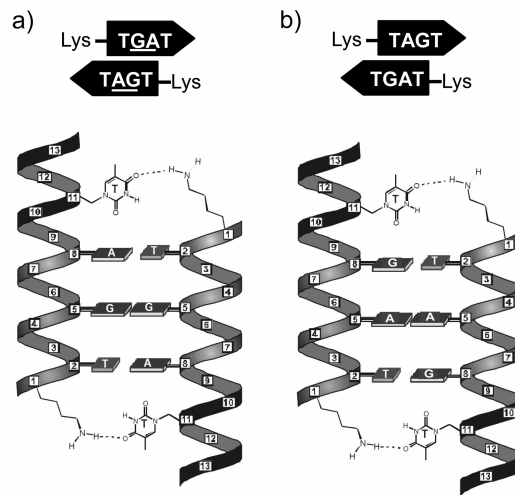
### 5.1.2 Oligomerisierung der Peptidnukleinsäuren

Die Bildung der PNA-Komplexe erfolgt über die funktionalisierten Seitenketten, welche in der Lage sind, untereinander Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Ähnlich wie bei der DNA-Doppelhelix sind Watson-Crick-Basenpaarungen für die Stabilität verantwortlich. Zwischen Adenin und Thymin bilden sich zwei Interaktionen, zwischen Guanin und Cytosin hingegen drei Wasserstoffbrücken aus.

Um den Einfluss der Wechselwirkungen auf die Oligomerisierung zu ermitteln, musste zuerst die Orientierung der Stränge bei der Komplexbildung ermittelt werden. Ohne diese Kenntnis hätte die Anzahl der sich bildenden Wasserstoffbrückenbindungen nicht exakt bestimmt werden können. Im Falle der DNA-Doppelhelix paaren sich die beiden Stränge gegenläufig, wobei das 5'-Ende des einen Strangs mit dem 3'-Ende des anderen Strangs interagiert [5]. Auch die Strang-Orientierung von helikalen Peptid-Oligomeren erfolgt in der Regel antiparallel, da sich die verschiedenen Enden aufgrund unterschiedlicher Ladungen gegenseitig anziehen. In den verwendeten Peptidnukleinsäuren lag der C-Terminus als Säureamid und damit ungeladen vor, weshalb die Strang-Orientierung nicht durch eine Anziehung der Termini bestimmt wurde. Trotzdem konnte eine verstärkte Oligomerisierung für antiparallel interagierende Helices verzeichnet werden (vgl. Abb. 32 und Abb. 33). Diese Beobachtungen wurden durch die Ergebnisse der Diederichsen Gruppe bestätigt, welche mit einem FTICR-Gerät erhalten wurden [125]. Auch Schmelzkurven-Experimente zeigten höhere Stabilitäten für antiparallele Oligomere, was die bevorzugte Orientierung der PNA-Stränge bekräftigte [37, 125].

Von den in dieser Arbeit untersuchten Peptidnukleinsäuren war das ACGT-Peptid als einzige Peptidnukleinsäure in der Lage, unter einer antiparallelen Orientierung der Stränge Homo-Dimere auszubilden, die vollständig über Watson-Crick-Basenpaarung stabilisiert wurden. Im Vergleich zu den anderen Peptiden zeigte das ACGT dadurch ein höheres Oligomerisierungsverhalten (vgl. Abb. 35). Die Peptide ACTA, TAGT und TGAT, welche keine komplementären Basenpaarungen eingehen konnten, wiesen jedoch ebenfalls einen hohen Dimeranteil auf. Hierfür mussten andere Wechselwirkungen verantwortlich sein.

In früheren Publikationen der Diederichsen Gruppe wurde für das TGAT anhand von UV-Schmelztemperaturkurven bereits eine hohe Homo-Oligomerisierung festgestellt [37]. Zurückzuführen war diese Oligomerisierung auf die Ausbildung einer möglichen Wasserstoffbrückenbindung zwischen C-terminalem Thymin und N-terminalen Lysin-Seitenketten (T-Lys-Wasserstoffbrückenbindung). Durch eine leichte Verschiebung der beiden Helixstränge könnte sich diese Wechselwirkung an beiden Enden des Doppelstrangs ausbilden (Abb. 70 a). Das TGAT-Homo-Dimer erreicht durch diese Zusammenlagerung eine zusätzlich Stabilisierung über zwei A-T-Paare.



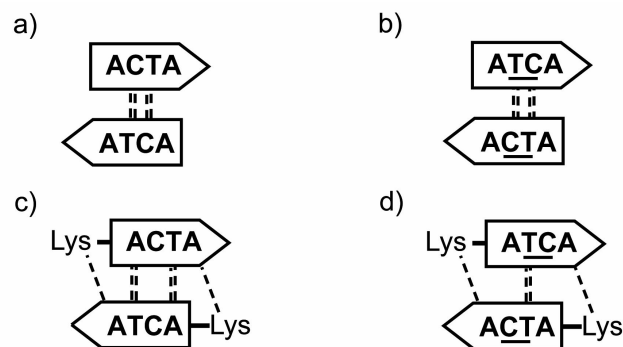
**Abb. 70 a und b: Schematische Darstellung eines TGAT-Homo-Dimers und eines TAGT-Homo-Dimers.** Durch eine leichte Verschiebung der beiden Helices kann eine Interaktion zwischen dem C-terminalen Lysin der einen Helix und dem N-terminalen Thymin der anderen Helix ausgebildet werden. Das TGAT-Dimer erhält durch die Verschiebung der beiden Helices eine zusätzliche Stabilisierung über zwei spezifische A-T Interaktionen, welche sich im Falle des TAGT-Dimers nicht ausbilden lassen. Abbildung verändert nach [37].

Auch im Dimer des spiegelbildlich aufgebauten TAGT-Peptids könnten zwei dieser T-Lys-Wechselwirkungen ausgebildet werden, jedoch keine zusätzlichen Watson-Crick-Basenpaarungen (Abb. 70 b). Im Vergleich zum TGAT wäre daher eine geringere Stabilität sowie eine schlechtere Oligomerisierung zu erwarten. Beide Peptide wiesen ein annähernd gleiches Oligomerisierungsverhalten auf, weshalb weitere Paarungsmodi bei ihrer Komplexbildung zu berücksichtigen sind. Aufgrund der linearen Topologie werden die Peptidnukleinsäuren neben Watson-Crick-Basenpaarungen auch über andere Wechselwirkungen, wie zum Beispiel der Hoogsteen- und der *reversen* Hoogsteen-Paarungen, stabilisiert (siehe Kapitel 1.1.3.2). Eine Publikation der Diederichsen Gruppe zeigte, dass sich weitere Interaktionen gemäß dem Watson-Crick-Modus ausbilden können [42]. Demnach gehören auch T-T-, C-C<sup>+</sup>-, T-C- und T-G-Paarungen zu den spezifischen Watson-Crick-Wechselwirkungen. Interaktionen zwischen A-A, C-C, G-G und A-C hingegen weisen auf eine unspezifische Oligomerisierung hin.

Berücksichtigt man diese Interaktionen im Falle des TAGT-Homo-Dimers, so tragen neben den beiden T-Lys-Wechselwirkungen zwei weitere, spezifische T-G-Interaktionen mit je zwei Wasserstoffbrückenbindungen zur Oligomerisierung bei. Für das TGAT-Homo-Dimer ändert sich an der Anzahl der sich ausbildenden Wechselwirkungen nichts. Aus diesem Grund bilden die Homo-Dimere TAGT und TGAT eine gleiche Anzahl an Wechselwirkungen aus, welche die Dimere stabilisieren. Dadurch lässt sich ein ähnliches Oligomerisierungsverhalten erklären.

Auch das ACTA-Homo-Dimer zeigte ein ähnliches Oligomerisierungsverhalten. Die bekannten A-T- und G-C-Paarungen tragen auch in diesem Dimer nicht zur Stabilisierung der Helices bei (Abb.

71 a). Eine antiparallele Orientierung lässt lediglich die Interaktion zwischen zwei Adeninen sowie die Interaktion zwischen einem Cytosin und einem Thymin zu (Abb. 71 a). Die T-C-Interaktionen sind nach Diederichsen *et al.* spezifische Wechselwirkungen und begünstigen die Oligomerisierung. Insgesamt werden 4 Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet. Durch die Verschiebung der Helices könnte eine größere Anzahl von Wechselwirkungen ausgebildet werden (Abb. 71 c). Neben zwei A-T-Paarungen bilden sich dann auch Wechselwirkungen zwischen Lysin und Adenin aus. Durch diese Anordnung werden 6 Wasserstoffbrückenbindungen gebildet. Dies entspricht der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen der TAGT- und TGAT-Dimere, was sich in einem ähnlichen Oligomerisierungsverhalten bemerkbar macht.



**Abb. 71: Mögliche Kombinationen bei der Zusammenlagerung zweier PNA-Helices.** a und c) ACTA-Homo-Dimer. b und d) ATCA-Homo-Dimer. Paaren sich die Helices ohne Verschiebung, so bilden sich in beiden Peptid-Dimeren jeweils zwei A-A- und zwei T-C-Wechselwirkungen aus, was ein ähnliches Oligomerisierungsverhalten zur Folge hätte. Durch eine kleine Verschiebung der Helices geht das ACTA-Dimer aufgrund der 6 möglichen Wasserstoffbrückenbindungen als das stabilere Dimer hervor. Im Falle des ATCA können sich mit dieser Anordnung lediglich 4 Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden.

Das spiegelbildlich aufgebaute ATCA verhält sich hinsichtlich der Oligomerisierung anders als das ACTA-Peptid. Ein Dimeranteil von nur 3 wies auf eine schlechtere Interaktion der beiden Helices hin. Paaren sich die Helices gleichmäßig (ohne Verschiebung), so bilden sich die gleichen Wechselwirkungen wie im ACTA-Dimer aus, wodurch sich das unterschiedliche Oligomerisierungsverhalten nicht erklären lässt (Abb. 71 a und b). Durch eine geringfügige Verschiebung der Helices werden wiederum die Lysin-Seitenketten zur Stabilisierung der Oligomere herangezogen. Daneben interagieren zwei A-C-Paare und ein T-T-Paar miteinander (Abb. 71 d). Lediglich die T-T-Wechselwirkung zählt zu den spezifischen Interaktionen und trägt maßgeblich zur Oligomerisierung bei. Insgesamt wurden daher nur 4 Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet, was eine geringere Oligomerisierung bewirkte.

Abhängig von der Sequenz der Peptidnukleinsäuren konnten mit der massenspektrometrischen Analyse Unterschiede im Oligomerisierungsverhalten aufgezeigt werden, welche sich mit den von Diederichsen publizierten, spezifischen Watson-Crick-Paarungen erklären lassen.

### 5.1.3 Hämbindung und Cofaktor-induzierte Oligomerisierung

Cytochrome sind Häm-bindende Proteine, weshalb auch im Fall des Cytochrom  $b'_{559}$ -Peptids die Abhängigkeit der Aminosäuresequenz in Bezug auf die Hämbindung untersucht wurde. Die Röntgenstruktur des Cytochrom  $b_{559}$  erlaubte das Aufzeigen von möglichen Interaktionen zwischen der Hämgruppe und der Polypeptidkette [98]. Eine Wechselwirkung könnte aufgrund des geringen Abstands zwischen der Hämgruppe und der Peptidkette auf das Arginin in Position 18 zurückgeführt werden. Die positiv geladene Seitenkette könnte an einer Interaktion mit der Hämbindung teilnehmen und so zur Stabilisierung beitragen. Schneider *et al.* bestätigten dies. Eine Mutation von Arginin zu Alanin unterdrückte in diesen Versuchen die Ausbildung von Peptid-Häm-Komplexen, weshalb Arginin als Hämbindestelle postuliert wurde [49]. In den Massenspektren wurden für beide Mutanten Komplexe detektiert, weshalb andere Aminosäuren an der Hämbindung beteiligt sein mussten. Als eigentliche Hämbindestelle wird ein Histidinrest beschrieben, welcher zu beiden Seiten der Hämebene binden kann. Sowohl in der Cytochrom b-Wildtypsequenz als auch in der Mutante befindet sich ein Histidin in Position 23, welches aktiv an der Hämbindung beteiligt sein muss. Dies wurde auch mit der Röntgenstrukturanalyse bestätigt [98]. Da die Komplexbildung der Cytochrom b-Mutante massenspektrometrisch keinen Unterschied aufzeigte, ist das Arginin entweder gar nicht, oder nur zu einem geringen Anteil an der Hämbindung beteiligt. Wird die Hämbindung durch das Arg-18 unterstützt, so müssten sich Stabilitätsunterschiede aufzeigen lassen, welche mit Hilfe von CID-Messungen ermittelt werden können. Diese Ergebnisse werden zu einem anderen Zeitpunkt detaillierter diskutiert.

Die  $\beta$ -Untereinheit des Cytochrom  $b'_{559}$ -Peptids ist weiterhin dafür bekannt, dimere Strukturen auszubilden. Francke *et al.* zeigten 1999, dass die Ausbildung von Oligomeren durch die An- oder Abwesenheit einer Hämgruppe gesteuert wird. Des Weiteren wurde eine Abhängigkeit vom Oxidationszustand des zentralen Eisenatoms beobachtet. Lediglich Ferro-(II)-Häm war in der Lage, die Oligomerisierung auszulösen [48]. Schneider *et al.* postulierten hingegen, dass weder der Redoxzustand noch die Hämgruppe selbst einen Beitrag zur Oligomerisierung liefern [50]. Sie verzeichneten mit dem *in vivo* GALLEX-System lediglich eine geringe Steigerung der Oligomerisierung unter Anwesenheit der Hämgruppe. Ihre Versuche zeigten somit nur einen geringen Einfluss des Cofaktors auf die Oligomerisierung der  $\beta$ -Untereinheit.

Mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse konnte die Zusammenlagerung der beiden Helixstränge weder vor noch nach der Hämzugabe beobachtet werden (Abb. 37 a). Aufgrund des limitierten  $m/z$ -Messbereichs war ein  $\beta_2$ -Homo-Dimer erst ab einem Ladungszustand von 5+ detektierbar. Ein Nachweis von niedrigeren Ladungszuständen war wegen der Detektionsgrenze des Messgerätes nicht möglich. Ähnlich wie bei den anderen, in dieser Arbeit verwendeten, niedermolekularen VSV- und PNA-Peptiden wurden die Monomere der Cytochrom b-Komplexe in den Ladungszuständen 4+ und 5+ detektiert. Die Dimere der VSV- und der PNA-Peptide lagen ausschließlich als 3-fach geladene Oligomere vor. Verhalten sich die Cytochrom  $b'_{559}$ -Komplexe

ähnlich, so müssten sie ebenfalls als 3-fach geladene Dimere gebildet werden. Da deren m/z-Wert außerhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Gerätes liegt, konnten sie jedoch nicht detektiert werden. Um auszuschließen, dass sich keine Cytochrom b'<sub>559</sub>-Dimere bilden, müsste daher ein anderes Massenspektrometer herangezogen werden, mit welchem sich ein höherer Messbereich exakt detektieren lässt.

#### 5.1.4 CID-Messungen der niedermolekularen Peptid-Komplexe

Um Stabilitätsunterschiede innerhalb eines Systems und im Vergleich zu verschiedenen Komplexsystemen aufzuzeigen, wurden von den nachweisbaren Komplexen aller Peptid-Systeme kollisions-induzierte Messungen durchgeführt.

Die Stabilitäten der VSV-Peptide sollten sich aufgrund einer variablen Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen unterscheiden. Neben der vermuteten Wasserstoffbrücke zwischen Thr-2 und Val-84 in der VSV V2T,F14L-Sequenz müssten auch die anderen VSV-Mutanten eine unterschiedliche Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Die von den Glycinresten ausgehenden C<sub>α</sub>-H...O Wasserstoffbrücken besitzen in Vakuum eine Energie von 2,5-3 kcal/mol, was in etwa der Hälfte einer herkömmlichen Wasserstoffbrücke entspricht [87, 120, 121]. Da die Alaninmutanten des VSV-Wildtyps weniger C<sub>α</sub>-H...O Wasserstoffbrücken ausbilden können, sollten diese auch weniger stabil sein. Die E50%-Werte der VSV-Peptide zeigten keine Varianzen in den Stabilitäten (vgl. Abb. 57). Auch die nach der Energienormierung erhaltenen Dissoziationsenergien wiesen auf ähnliche Stabilitäten der VSV-Peptide hin. Der Mittelwert aller Dissoziationsenergien betrug  $9,6 \pm 1,0$  kcal/mol, wobei gleichermaßen die Energien mit multiplen Stößen und die eines effektiven Stoßes einbezogen wurden. Die Abweichung ist geringer, wenn nur eine der Energieberechnungen berücksichtigt wird. Fleming *et al.* publizierten 1997 und 2002 Dissoziationsenergien eines Glykophorin A-Dimers in C<sub>8</sub>E<sub>5</sub>-Micellen von 9,1 kcal/mol bzw. 7,0 kcal/mol [126, 127]. Die über CID-Messungen ermittelten Dissoziationsenergien entsprechen somit den Literaturwerten. Mittels Sedimentationsmessungen konnten Doura und Fleming Energieunterschiede in verschiedenen Glykophorin A-Mutanten nachweisen. Für die Alanindoppelmutanten ermittelte die Forschungsgruppe einen Stabilitätsunterschied von 3,6 kcal/mol [25]. Da die hier durchgeführten CID-Messungen keine Unterschiede aufzeigten, scheinen die in dieser Arbeit durchgeführten CID-Messungen zur Quantifizierung geringer Stabilitätsunterschiede nicht geeignet zu sein.

Auch die Homo-Dimere der Peptidnukleinsäuren unterscheiden sich in der Anzahl der stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen. Im ACGT-Homo-Dimer werden zehn Interaktionen, in den Homo-Dimeren der TAGT-, TGAT- und ACTA-Peptide jeweils sechs Wechselwirkungen und

im ATCA-Dimer vier Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet (siehe Kapitel 5.1.2). Die mittels CID-Messungen bestimmten E50%-Werte der Dimere sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

**Tabelle 15: E50%-Werte der PNA-Homo-Dimere.**

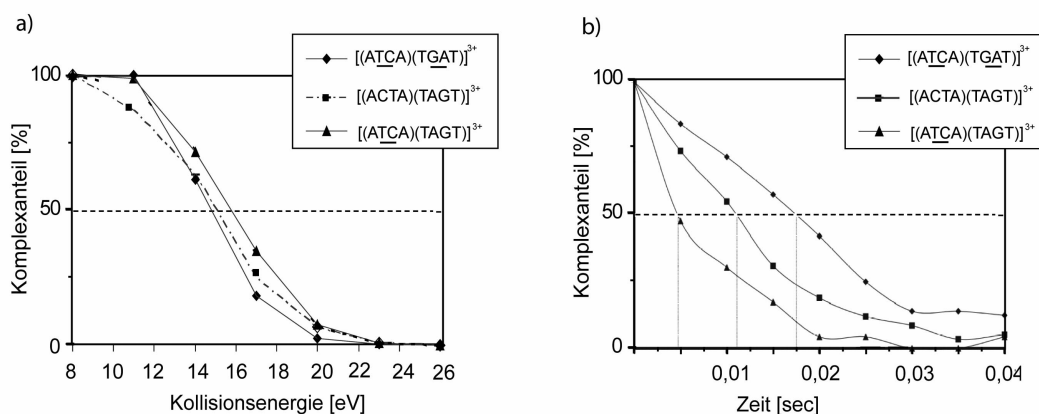
Komplex	E50% [eV]	T <sub>m</sub> [°C] <sup>[37]</sup>
[(ACGT) <sub>2</sub> ] <sup>3+</sup>	16,5	72
[(ACTA) <sub>2</sub> ] <sup>3+</sup>	15,5	< 0
[( <u>ATCA</u> ) <sub>2</sub> ] <sup>3+</sup>	14,5	< 5
[(TAGT) <sub>2</sub> ] <sup>3+</sup>	20,0	< 5
[( <u>TGAT</u> ) <sub>2</sub> ] <sup>3+</sup>	18,0	28

Den höchsten E50%-Wert besaß das TAGT-Homo-Dimer mit 20 eV. Das ACGT-Dimer, welches über die meisten Interaktionen stabilisiert wird, besaß einen mittleren E50%-Wert von 16,5 eV. Für das ATCA-Homo-Dimer mit nur vier Wasserstoffbrücken wurde der geringste E50%-Wert mit 14,5 eV ermittelt. An der Stabilitätsreihenfolge änderte sich auch nach der Energienormierung nichts. TAGT wurde mit der Multi-Stoß-Berechnung eine Energie von 11,7 kcal/mol und mit der Ein-Stoß-Berechnung eine Energie von 13,3 kcal/mol zugeordnet. Für das ATCA lagen die Energien bei 8,5 kcal/mol bzw. bei 9,8 kcal/mol. Der Dissoziationswert für das ACGT-Dimer betrug nach der Ein-Stoß-Berechnung 11,1 kcal/mol und entspricht dem Dissoziationswert, wie er von Chakraborty mittels konzentrationsabhängiger Schmelztemperaturen ermittelt wurde [37]. Eine Vergleichbarkeit zwischen Flüssig-Phasen- und Gas-Phasen-Stabilitäten konnte für dieses Dimer eindeutig nachgewiesen werden.

In der Literatur findet man von Chakraborty *et al.* weitere Experimente, mit welchen die Schmelztemperaturen (T<sub>m</sub>) der Homo-Dimere ermittelt wurden [37]. Die entsprechenden Schmelztemperaturen sind ebenfalls in der Tabelle 15 dargestellt. Aus seinen Untersuchungen ging das ACGT-Homo-Dimer als stabilstes Dimer hervor. Auch das TGAT-Homo-Dimer besaß gegenüber den anderen PNA-Dimeren eine hohe Stabilität. Diese Reihenfolge konnte mit den CID-Messungen nicht bestätigt werden, da sich auch in diesen Messungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Peptiden aufzeigen ließen. Diederichsen *et al.* bestätigen jedoch auch für unspezifische Wechselwirkungen insbesondere für die A-A-, A-C- und A-G-Interaktionen hohe Stabilitäten [42]. Die Ausbildung dieser Interaktionen ist auch in den hier untersuchten Komplexen möglich, wodurch eine Zuordnung der ermittelten Stabilitäten zur Anzahl der stabilisierenden Wechselwirkungen nicht erfolgen konnte. Hinzu kam, dass, wie bereits bei den VSV-Peptiden gesehen, geringe Stabilitätsunterschiede durch die CID-Messungen nicht zu erfassen waren.



Besonders deutlich wird dies bei einem Vergleich der Dissoziationsprofile eines Q-TOF-Instrumentes mit denen eines IRMPD-Gerätes, wie es im Rahmen der Kooperation mit der Diederichsen Gruppe verwendet wurde [125]. Bei kollisions-induzierten Messungen wird die Dissoziation des massenselektierten Ions durch den Zusammenstoß mit neutralen Argonteilchen eingeleitet. Bei der Infrarot Multiphotonen Dissoziation (IRMPD) hingegen erfolgt die Fragmentierung durch den Beschuss der selektierten Moleküle mit einem CO<sub>2</sub>-Laser. Die CID-Profile von drei verschiedenen Hetero-Dimeren sind in Abb. 72 dargestellt. Anhand der sich ausbildenden Wechselwirkungen waren unterschiedliche Stabilitäten für die untersuchten Dimere zu erwarten. Die Hetero-Dimere [(ATCA)(TGAT)]<sup>3+</sup> und [(ACTA)(TAGT)]<sup>3+</sup> wurden über eine vollständig komplementäre Basenpaarung mit insgesamt neun Wasserstoffbrücken stabilisiert, während das [(ATCA)(TAGT)]<sup>3+</sup>-Hetero-Dimer lediglich über vier Wasserstoffbrücken verfügte. Diese Stabilitätsunterschiede waren mit der CID-Technik nicht quantitativ nachweisbar (Abb. 72 a), während die Stabilitätswerte, welche mit dem IRMPD-Gerät ermittelt wurden, eindeutige Unterschiede aufzeigten (Abb. 72 b). Um kleine Stabilitätsunterschiede zwischen niedermolekularen, nichtkovalenten Komplexen nachzuweisen, ist das IRMPD-Gerät somit besser geeignet als das Q-TOF-Gerät. Weiterführend zu dieser Arbeit wäre es somit sinnvoll, die Stabilitäten aller niedermolekularen Komplexe mit der IRMPD-Technik zu untersuchen. Mit dieser Methodik könnten sich eventuell auch die Stabilitätsunterschiede der VSV-Mutanten ermitteln lassen.



**Abb. 72: Dissoziationsprofile von PNA-Hetero-Dimeren unterschiedlicher Stabilität.** a) CID-Messung. b) IRMPD-Messung. Anhand dieser Profile wird ersichtlich, dass sich geringe Stabilitätsunterschiede mit einem CID-Gerät nicht erfassen lassen. Diese Unterschiede können mit Hilfe des IRMPD-Gerätes sichtbar gemacht werden [125].

Im Falle der Cytochrom b'<sub>559</sub>-Mutanten wurden die Stabilität der Hämbindung untersucht. Beide, zur Verfügung stehenden Mutanten waren in der Lage, eine Hämgruppe zu binden, da die eigentliche Hämbindestelle, das Histidin in Position 23, nicht von der Mutation beeinträchtigt wurde. Der Austausch betraf die Aminosäure Arginin in Position 18, welche als alternative bzw. zweite Hämbindestelle postuliert wurde.

Die mittels CID-Messungen erhaltenen E50%-Werte zeigten nur marginale Stabilitätsunterschiede zwischen den beiden Häm-Komplexen auf. Die R18A Mutante besaß mit einem E50%-Wert von 21 eV eine etwas geringere Stabilität als der Wildtyp mit 24 eV. Berücksichtigt man einen Fehler von  $\pm 1,5$  eV, wie er bei allen E50%-Werten angenommen wurde, so sind auch bei den Cytochrom b-Komplexen keine signifikanten Stabilitätsdifferenzen wahrzunehmen. Ob oder wie stark das Arginin an der Hämbindung beteiligt ist, war daher nicht nachweisbar. Auch in diesem Fall wäre die Charakterisierung der Cytochrom b-Komplexe durch die Verwendung eines IRMPD-Gerätes sinnvoll. Da bis dato keine Bindungsenergien für die Cytochrom b'-Komplexe publiziert wurden, konnte kein Vergleich mit Literaturwerten erfolgen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für niedermolekulare Komplexsysteme E50%-Werte ermittelt werden konnten, welche sich nach der Energienormierung mit literaturbekannten Bindungsenergien vergleichen ließen. Die mittleren Gas-Phasen-Dissoziationsenergien innerhalb eines Komplexsystems lagen dabei in ähnlichen Bereichen wie die Flüssig-Phasen-Bindungsenergien. Stabilitätsunterschiede innerhalb eines Systems bzw. zwischen verschiedenen Mutanten waren mit der CID-Technik nicht nachweisbar. Die CID-Untersuchungsmethode ist somit für die Ermittlung von geringen Stabilitätsunterschieden, wie sie für die niedermolekularen Komplexe aufzuzeigen waren, nicht geeignet. Diese Stabilitätsdifferenzen liegen daher an der Grenze der CID-Nachweisbarkeit. Mit Hilfe einer sensitiveren Dissoziationsmethode könnten auch für diese Komplexsysteme Stabilitätsdifferenzen nachgewiesen werden, wie dies z. B. mit den IRMPD-Messungen der PNA-Dimere gezeigt wurde.

## 5.2 Ausbildung verschiedener Protein-Ligand-Komplexarten

Für die untersuchten, höhermolekularen Protein-Ligand-Komplexe konnten unterschiedliche Komplexarten nachgewiesen werden. In Abhängigkeit der Ligandkonzentration waren zum Beispiel verstärkt höhere Oligomere detektiert worden, während die Verwendung unterschiedlicher Ligandsysteme oder Proteine zur Bildung von spezifischen und unspezifischen Komplexen führte. Durch die Zugabe von Denaturierungsreagenzien wurden auch teilentfaltete Übergangszustände, sogenannte *Molten Globules*, detektiert.

### 5.2.1 Höhere Oligomere

Zu Beginn wurde die Komplexbildung der Protein-Ligand-Komplexe in Abhängigkeit steigender Ligandkonzentration untersucht. Dabei bildeten sich je nach Bindungskapazität des Proteins höhere Komplexe spezifischer oder unspezifischer Natur. Unter der Bindungskapazität versteht man die Anzahl der Bindungspositionen, an welche die Liganden binden können. Ist die Anzahl der

gebundenen Liganden höher als die Anzahl der zur Verfügung stehenden Bindungspositionen, wird meist von einer unspezifischen Oligomerisierung ausgegangen. Dies wurde anhand des Lysozysystems für verschiedene Liganden untersucht.

Die Bindungsstudien zwischen Lysozym und acetylierten Liganden unterschiedlicher Kettenlänge zeigten, dass die Komplexbildung erst ab einer bestimmten Ligandkonzentration einsetzte. GlcNAc<sub>3</sub> und das kürzere GlcNAc<sub>2</sub> interagierten bereits unter einer Ligandkonzentration von 10 µM mit dem Protein, während zur Komplexbildung des Monosaccharids GlcNAc höhere Konzentrationen eingesetzt werden mussten. Eine Steigerung der Ligandkonzentration bewirkte unabhängig von der Art des verwendeten Liganden auch die Ausbildung höherer Protein-Ligand-Komplexe. Im Falle der kürzerkettigen GlcNAc- und GlcNAc<sub>2</sub>-Liganden nahmen die Signalintensitäten aller zu detektierenden Komplexe proportional mit der Konzentrationssteigerung zu. Als Folge der erhöhten Konzentration interagierte eine größere Anzahl der Liganden mit dem Protein, was sich durch die Detektion höherer Komplexe bemerkbar machte. Im Falle der Chitotriose GlcNAc<sub>3</sub> konnte keine kontinuierliche Zunahme der Komplexintensitäten mit steigender Ligandkonzentration beobachtet werden. Besonders auffällig war dies am Intensitätsverlauf des 1:1-Komplexes. Nach einem kontinuierlichen Anstieg bis zu einer Ligandkonzentration von 30 µM erreichte die Intensität zunächst ein Plateau. Danach wurde eine Abnahme der Intensität verzeichnet. Zeitgleich mit der Intensitätsabnahme wurde die Detektion des 1:4-Komplexes beobachtet. Dies ließ die Vermutung aufkommen, dass sich der 1:4-Komplex aus dem 1:1-Komplex gebildet hatte, was durch die gleichzeitige Anlagerung dreier GlcNAc<sub>3</sub>-Liganden an den 1:1-Komplex möglich wäre. Die Anlagerung von drei einzelnen Liganden war zunächst ungewöhnlich, aber anhand der EICs zeigte sich, dass eine Aggregation der GlcNAc<sub>3</sub>-Moleküle ebenfalls ab einer Konzentration von 30 µM einsetzte, wodurch trimere Konstrukte zu detektieren waren. Die Ausbildung des 1:4-Komplexes wurde daher auf die Zusammenlagerung eines GlcNAc<sub>3</sub>-Trimers und einem [Lys(GlcNAc<sub>3</sub>)]-Komplex zurückgeführt. Aufgrund der beschränkten Bindungskapazität des Lysozys musste die Anlagerung des (GlcNAc<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Moleküls auf der Proteinoberfläche stattfinden. Lediglich das erste GlcNAc<sub>3</sub> war in der Lage, spezifisch in der hydrophoben Tasche zu binden.

Über CID-Messungen wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Zhen Yang die E50%-Werte aller [Lys(GlcNAc<sub>3</sub>)<sub>x</sub>]-Komplexe mit x = 1-4 bestimmt [128]. Es sollte untersucht werden, ob die Abspaltung eines unspezifisch gebundenen Liganden durch eine geringere Komplexstabilität vorhergesagt werden kann. Die E50%-Werte lagen jedoch für alle Komplexe bei 25-26 eV. Die Abspaltung eines einzelnen, weniger gut gebundenen Liganden von der Proteinoberfläche oder eines unspezifisch gebundenen (GlcNAc<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Aggregats konnte auch bei der Analyse der entstehenden Fragmente nicht beobachtet werden. Um die Dissoziationsenergie eines einzelnen Liganden zu ermitteln, müssten bei der Dissoziation der [Lys(GlcNAc<sub>3</sub>)<sub>x</sub>]<sup>8+</sup>-Komplexe folgende Fragmente detektiert werden: [Lys(GlcNAc<sub>3</sub>)<sub>x-1</sub>]<sup>7+</sup> und [GlcNAc]<sup>1+</sup>. Die Produktspektren zeigten bei hohen Kollisionsenergien (41 eV) jedoch die gleichzeitige Abspaltung mehrerer Liganden an. Die

Bindungsstärke der verschiedenen Liganden war daher sehr ähnlich, was sich sowohl in der gleichzeitigen Abspaltung mehrerer Liganden als auch in einem gleichen E50%-Wert bemerkbar machte.

Diese Untersuchungen zeigten eindeutig, dass sich die höheren Komplexe aus den bereits bei geringen Ligandkonzentrationen vorliegenden 1:1-Komplexen ausgebildet hatten. Durch die Dissoziation der höheren Lysozym-Komplexe konnte jedoch nicht zwischen einer spezifischen und einer unspezifischen Anlagerung der Liganden unterschieden werden. Die simultane Abspaltung mehrerer Liganden verhinderte die Ermittlung der Bindungsstärke eines einzelnen Liganden. Eine Unterscheidung zwischen spezifischer und unspezifischer Komplexbildung konnte mit Hilfe verschiedener Liganden und der Analyse der daraus entstehenden 1:1-Komplexe unter Verwendung der CID-Methode vorgenommen werden. Diese wird im Nachfolgenden eingehend diskutiert.

### 5.2.2 Spezifische und unspezifische Komplexbildung

Experimente, die eine Unterscheidung zwischen spezifischer Komplexbildung und unspezifischer Aggregation ermöglichen, wurden mit unterschiedlichen Liganden durchgeführt. Acetylierte Liganden  $\text{GlcNAc}_n$  sind aufgrund ihrer Acetylketten in der Lage, über Wasserstoffbrückenbindungen im hydrophoben Spalt des Proteins zu binden. Nichtacetylierte Liganden  $\text{GlcN}_n$  können keine Wasserstoffbrücken mit dem Protein ausbilden. Wird die Ligandkonzentration jedoch entsprechend hoch gewählt, können auch für nichtacetylierte Liganden Komplexe mit Lysozym beobachtet werden (vgl. Abb. 50 b). Mit Hilfe von CID-Messungen wurden die Stabilitäten der verschiedenen Komplexe ermittelt. Für den  $[\text{Lys}(\text{GlcNAc}_3)]$ -Komplex wurde ein E50%-Wert von 26 eV, für den  $[\text{Lys}(\text{GlcN}_3)]$ -Komplex ein Wert von 16 eV bestimmt. Die Differenz von 10 eV wies auf eine eindeutig geringere Stabilität für den nichtacetylierten Liganden hin.

Die gleichen Versuche wurden mit Cytochrom C durchgeführt. Dieses Protein besitzt ebenfalls eine hydrophobe Tasche – sie ist jedoch bereits mit einer kovalent gebundenen Hämgruppe besetzt und kann weder den acetylierten noch den nichtacetylierten Liganden in ihrem Inneren binden. Trotzdem konnten auch in diesem Fall Protein-Ligand-Komplexe detektiert werden. E50%-Werte von 16 eV bzw. 18 eV wiesen jedoch auf keine große Stabilitätsdifferenz hin. Nach der Energienormierung unter Verwendung der Ein-Stoß-Berechnung veränderten sich die Dissoziationsenergien, so dass für den nichtacetylierten Lysozym-Komplex und den entsprechenden Cytochrom C-Komplex ähnliche Werte erhalten wurden. Es wurden Dissoziationsenergien von 6,0 kcal/mol für den Cytochrom C-Komplex und von 6,9 kcal/mol für den Lysozym-Komplex errechnet. Der Lysozym-Komplex mit acetylierten Liganden war mit einer

Dissoziationsenergie von 12,7 kcal/mol deutlich höher, was auf eine spezifische Komplexbildung hinwies.

Durch die Einbeziehung der Komplexeigenschaften ließen sich auch für die Cytochrom C-Komplexe mit GlcNAc<sub>3</sub> und mit GlcN<sub>3</sub> unterschiedliche Dissoziationsenergien aufzeigen. Obwohl beide Liganden auf der Proteinoberfläche komplexiert werden mussten, war der acetylierte Ligand über seine Acetylgruppen in der Lage, mit entsprechenden, auf der Oberfläche lokalisierten Aminosäuren Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Dadurch kam diesem Komplex eine um 4,1 kcal/mol höhere Stabilität zu als dem Komplex mit einem nichtacetylierten Liganden.

Für die spezifischen Lysozym-Komplexe konnten außerdem Affinitäten in Form von Dissoziationskonstanten ( $K_D$ -Werte) mittels Scatchard-Plot-Auftragungen bestimmt werden. Mit Hilfe der  $K_D$ -Wert Bestimmung konnte auch für den kürzerkettigen GlcNAc<sub>2</sub>-Liganden eine spezifische Interaktion mit dem Lysozym bestätigt werden. Ein Vergleich mit Literaturwerten lieferte außerdem eine gute Übereinstimmung der Dissoziationskonstanten (Tabelle 16). Die Werte lagen unabhängig von der verwendeten Messmethode in einem ähnlichen Bereich, was auf ähnliche Komplexstabilitäten in der Flüssig- und in der Gas-Phase schließen ließ.

<b>Tabelle 16: Ermittelte Dissoziationskonstanten für die spezifischen Lysozym-Komplexe mit den Liganden GlcNAc<sub>2</sub> und GlcNAc<sub>3</sub> im Vergleich zu Literaturdaten.</b>				
	<b>MS<sup>a</sup></b>	<b>MS<sup>b</sup></b>	<b>MS<sup>c</sup></b>	<b>UV<sup>d</sup></b>
<b>GlcNAc<sub>2</sub></b>	76 µM	118 µM	133 µM	180 µM
<b>GlcNAc<sub>3</sub></b>	11 µM	23 µM	1 µM	6,6 µM

a) ESI-MS-Flusssystem-Messung in 10 mM Ammoniumacetat (pH 5,2) bei 20°C  
 b) ESI-MS-Einzeltitrationen in 10 mM Ammoniumacetat (pH 5,2) bei 20°C [101]  
 c) ESI-MS-Einzeltitrationen in 25 mM Ammoniumacetat (pH 8,2) [129]  
 d) Ionenstärke: 0,1, pH 5,0 bei 25°C [99]

Anhand der ermittelten  $K_D$ -Werte konnte mit folgender Formel (9) die Bindungsenergie der Komplexe berechnet werden:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_A \quad (9)$$

mit:  $R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  (Gaskonstante)  
 $T = 293 \text{ K}$

$K_A$  steht für die Assoziationskonstante der Komplexe, welche sich aus dem Kehrwert der Dissoziationskonstante errechnet. Für den [Lys(GlcNAc<sub>3</sub>)]-Komplex wurde mit dieser Berechnung eine Bindungsenergie von -6,6 kcal/mol berechnet. Diese ist etwa um die Hälfte geringer als die, welche nach der Energienormierung erhalten wurde (12,7 kcal/mol). Auch die Bindungsenergien

aus den Literaturwerten sind im Allgemeinen geringfügig kleiner. Da sich die Energiewerte in einen gleichen Energiebereich einordnen lassen, kann von vergleichbaren Dissoziationswerten in der Flüssig- und Gas-Phase ausgegangen werden.

Für den GlcNAc-Komplex konnte aufgrund der geringen Komplexdetektion keine Affinitätskonstante ermittelt werden. Diese Beobachtung spricht für die geringste Affinität der drei verwendeten, acetylierten Liganden. Auch in der Literatur findet man lediglich Dissoziations- bzw. Bindungsenergien für höherkettige Liganden. Die Affinitäten nehmen dabei mit zunehmender Kettenlänge zu, ähnlich wie dies aus Flüssig-Phasen-Messungen bekannt ist [129].

Anhand dieser Untersuchungen wurde zum Einen gezeigt, dass sich für größere Komplexsysteme Stabilitätsunterschiede mit Hilfe von kollisions-induzierten Messungen anzeigen lassen. Zum Anderen konnte eindeutig zwischen spezifischen und unspezifischen Komplexen anhand ihrer Stabilitäten unterschieden werden. Die aus den E50%-Werten ermittelten Dissoziationskonstanten ließen sich außerdem gut in den aus der Literatur bekannten Energiebereich der Lysozym-Komplexe eingliedern, was auf eine gute Korrelation der Gas-Phasen-Daten mit den Flüssig-Phasen-Daten hinweist.

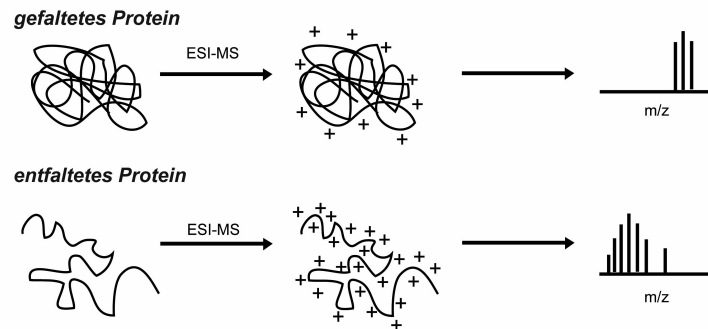
### **5.2.3 Protein-Komplexe in verschiedenen Faltungszuständen**

Bei der Komplexierung von Proteinen und Liganden können verschiedene Arten von Komplexen gebildet werden. Ihre Existenz ist abhängig von der Art der verwendeten Liganden und zugleich von der eingesetzten Ligandkonzentration. Hierbei unterscheidet man, wie bereits gesehen, zwischen spezifischen und unspezifischen 1:1-Komplexen sowie höheren Komplexen. Eine weitere Komplexart entsteht z. B. unter denaturierenden Bedingungen, wie man sie durch Zusatz von DTT und TFE oder durch die Änderung des pH-Wertes erhält. Bei den Hämproteinen wurde dadurch die Freisetzung des Liganden aus den nichtkovalenten Komplexen induziert. In Abhängigkeit von den verwendeten Messbedingungen waren dann neben einzelnen, frei vorliegenden Komplexbestandteilen auch teilentfaltete Zwischenformen mit und ohne Ligand detektierbar.

#### *5.2.3.1 Native und entfaltete Protein-Komplexe*

Die Oligomerisierung von Peptiden war, wie in Kapitel 4.3.1.3 aus der Korrelation zwischen dem Oligomeranteil und der Sekundärstruktur der VSV-Peptide ersichtlich wurde, stark von der Struktur der Peptide abhängig. Auch Protein-Ligand-Komplexe werden durch Veränderungen der Proteinstruktur beeinflusst. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die räumliche Anordnung der

Proteine – ihre Tertiärstruktur. Native und ungefaltete Proteinstrukturen lassen sich, wie bereits 1990 von Loo *et al.* und Chowdhury *et al.* gezeigt, anhand ihrer Ladungsverteilung im Massenspektrum unterscheiden [130, 131]. Native Zustände tragen aufgrund ihrer kompakten Struktur und ihrer relativ kleinen Oberfläche nur wenige Ladungen, was sich im Massenspektrum mit einer engen Ladungsverteilung bei kleinen Ladungszuständen bemerkbar macht (Abb. 73).



**Abb. 73: Ionisierung der Proteine in einer ESI-Quelle.** Die MS-Signale eines gefalteten Proteins werden im Massenspektrum in einer engen Ladungsverteilung wahrgenommen. Die größere Oberfläche von entfaltenen Proteinen ermöglicht die Anlagerung von mehreren Protonen aus der Lösung, was im Massenspektrum anhand einer Ladungsverschiebung zu größeren Ladungszuständen beobachtet werden kann. Abbildung bearbeitet nach [104].

Unter denaturierenden Bedingungen vergrößert sich die Oberfläche des Proteins und bietet den in der Lösung enthaltenen Protonen eine größere Fläche, um sich am Protein anzulagern. Eine Verbreiterung der Ladungsverteilung sowie die Detektion höherer Ladungszustände ist die Folge [104].

Eine solche Ladungsverschiebung war in geringem Ausmaß in einer angesäuerten Cytochrom C-Lösung zu beobachten (vgl. Abb. 51 b und d). Durch die Säurezugabe wurde die Entfaltung der Proteinstruktur induziert, was sich in der eben beschriebenen Ladungsverschiebung äußerte. Eine deutlichere Ladungsverschiebung zeigte sich durch den Zusatz von TFE (vgl. Abb. 54 a-d). In dieser Studie ließen sich in Abhängigkeit von der verwendeten TFE-Konzentration die Cytochrom C-Komplexe bis zu einem Ladungszustand von 16+ detektieren. Die Entfaltung des Proteins beeinflusste jedoch nicht das Vorliegen des Cytochrom C-Komplexes. Durch die Entfaltung wurde zwar die hydrophobe Tasche, in welcher die Hämgruppe verankert war, weitestgehend zerstört, die kovalente Bindung zwischen Protein und der Hämgruppe blieb dabei jedoch erhalten. Bestehende, kovalente Komplexe lassen sich daher auch nicht von der Tertiärstruktur des Proteins beeinträchtigen.

Anders verhielten sich nichtkovalente Komplexe wie z. B. das untersuchte holo-Myoglobin. In der angesäuerten Myoglobinlösung konnten ausschließlich apo-Myoglobinsignale wahrgenommen werden (vgl. Abb. 51 c). Die breite Signalverteilung von Ladungszuständen zwischen 9+ und 22+ signalisierte eindeutig die Entfaltung der Tertiärstruktur. Die unter nativen Bedingungen

detektierbaren holo-Myoglobin-Komplexe wurden durch das Ansäuern der Lösung vollständig in apo-Myoglobin überführt. Die Freisetzung der Hämgruppe könnte dabei auf die Veränderung des pH-Wertes oder auf den Verlust der Tertiärstruktur zurückzuführen sein. Die Hämgruppe ist über verschiedene, nichtkovalente Interaktionen in der hydrophoben Tasche des Proteins gebunden, welche durch die Entfaltung der Struktur in ihrer Form zerstört wurde. Dadurch wurden die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem Liganden gelockert und in ihrer Stärke verringert. Andere Wechselwirkungen wie z. B. die zwischen den Propiongruppen und der Hämgruppe wären durch die Entfaltung der Proteinstruktur nicht beeinflusst worden und sollten gänzlich oder wenigstens zu einem gewissen Anteil erhalten bleiben. Durch die Verringerung des pH-Wertes werden die bei neutralem pH-Wert negativ geladenen Propiongruppen jedoch protoniert, wodurch die Wechselwirkung zum Liganden nicht mehr aufrecht erhalten werden kann. Eine Folge davon ist die Freisetzung der Hämgruppe und die Umwandlung zum apo-Myoglobin. Die Hauptursache für die Entstehung von apo-Myoglobin ist somit in der hier untersuchten angesäuerten Lösung nicht die Entfaltung der Proteinstruktur, sondern der Einfluss des pH-Wertes.

Die Abspaltung der nichtkovalent gebundenen Hämgruppe lässt sich unter anderen Bedingungen eindeutig auf die Veränderung der Tertiärstruktur zurückführen. In der TFE-Studie machte sich die Entfaltung der Proteinstruktur ebenfalls durch die bereits beschriebene Verschiebung der Ladungszustände bemerkbar (vgl. Abb. 53 a-d). Aufgrund der stetigen Zunahme des Denaturierungsreagenzes veränderte sich die Proteinstruktur stufenweise, so dass in den verschiedenen TFE-Wasser-Mischungen neben dem entstehenden apo-Myoglobin auch der holo-Myoglobin-Komplex detektiert werden konnte. Obwohl durch die Entfaltung der Struktur die hydrophobe Tasche des Proteins zerstört wurde und so die hydrophoben Kontakte zwischen Protein und Ligand beeinträchtigt wurden, waren die holo-Protein-Komplexe selbst bei einem hohen TFE-Gehalt noch nachweisbar. Die Intensität ihrer Signale wurde mit steigendem TFE-Gehalt jedoch kontinuierlich geringer.

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass sich kovalente Bindungen nicht von der Tertiärstruktur des Proteins beeinflussen lassen. Nichtkovalente Komplexe hingegen sind stark von der Proteinstruktur abhängig und können durch Veränderungen der Tertiärstruktur teilweise oder gänzlich zerstört werden. Eine Unterscheidung zwischen nativen und ungefalteten Proteinen erfolgte dabei anhand des Massenspektrums. Sowohl bei kovalenten als auch bei nichtkovalenten Komplexen lieferte die Detektion von höheren Ladungszuständen und die Verbreiterung der detektierbaren Signalverteilung Hinweise auf eine Veränderung der Tertiärstruktur.



### 5.2.3.2 Teilentfaltete Komplexe

Massenspektren eignen sich, wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt, hervorragend zur Unterscheidung zwischen nativen und ungefalteten Proteinzuständen. Bei der Bildung oder Dissoziation von Komplexen werden teilentfaltete Zwischenstufen durchlaufen, welche sich ebenfalls mit Hilfe des Massenspektrums genauer charakterisieren lassen.

Bereits 2000 beobachteten Douglas *et al.* für holo-Myoglobin-Komplexe eine durch Methanol-induzierte, bimodale Ladungsverteilung in einer mit pH 4 angesäuerten Lösung [105]. Erklärt wurde diese Ladungsverteilung mit der Entfaltung der Proteinstruktur, welche über einen intermediär gefalteten Zustand abläuft, wie er auch von Konermann *et al.* untersucht wurde [106, 107]. Die bimodale Ladungsverteilung zeigte das simultane Vorliegen zweier Zustände – den Übergangszustand sowie den nativen Zustand – an. Dies konnte auch in der hier vorliegenden Arbeit für verschiedene Hämproteine beobachtet werden.

Für das kovalente Cytochrom C ließen sich in den verschiedenen TFE-Wasser-Mischungen bimodale Ladungsverteilungen nachweisen (vgl. Abb. 54). Als primäres Maximum fungierte das 7-fach geladene Signal, als sekundäres Maximum das 11-fach geladene Signal des Komplexes. Im Massenspektrum eines nativen Cytochrom C-Komplexes dominiert das 7+ Signal, weshalb für die Ladungszustände um das primäre Maximum ein nativer Faltungszustand angenommen wird. Die Signale im unteren  $m/z$ -Bereich entstehen erst durch die TFE-Zugabe und lassen auf die Existenz entfalteter oder teilentfalteter Zustände schließen. Sekundärstrukturanalysen zeigten während der TFE-Titration eine Erhöhung der Helikalität für Cytochrom C-Komplexe an. Proteinformen, deren Tertiärstruktur verloren geht, obwohl sie eine annähernd native Sekundärstruktur aufweisen, werden „*Molten Globules*“ genannt. Sie treten als teilgefaltete Zwischenstufen bei der Entfaltung von Proteinen auf. Da es sich bei dem hier untersuchten Cytochrom C-Komplex um einen kovalenten Komplex handelt, konnte die Interaktionsstärke zwischen Protein und Ligand nicht in Abhängigkeit der Entfaltung analysiert werden. Hierzu wurden nichtkovalente Komplexe herangezogen.

Der holo-Myoglobin-Komplex verfügt über eine nichtkovalent gebundene Hämgruppe, weshalb der TFE-Zusatz einen anderen Einfluss auf die Komplexe ausübte, als beim Cytochrom C-Komplex. Von der 20%igen TFE-Lösung abgesehen, wurden in allen TFE-Lösungen sowohl holo- als auch apo-Myoglobinsignale detektiert (vgl. Abb. 53). Die breitere Ladungsverteilung und die Detektion höherer Ladungszustände beider Myoglobinformen (holo- und apo-Mb) wies auch hier auf eine Entfaltung der Proteinstruktur hin. Eine bimodale Ladungsverteilung konnte für das apo-Myoglobin beobachtet werden. Das Vorliegen verschiedener Faltungszustände für das apo-Protein ließ vermuten, dass bereits geringe Veränderungen in der Tertiärstruktur die Hämgruppe freisetzen. Dagegen sprechen allerdings die breite Ladungsverteilung und die hohen Ladungszustände, welche auch für das holo-Protein detektiert wurden und welche die fortschreitende Entfaltung der

holo-Komplexe andeuteten. Dem dominierenden Signal des holo-Myoglobins einer 40%igen TFE-Lösung entspricht in etwa das dominierende Signal einer Lösung ohne TFE, weshalb zunächst keine Veränderung der Tertiärstruktur und der Interaktionsstärke vermutet wurde. CID-Messungen zeigten jedoch unterschiedliche Interaktionsstärken auf. Für das 9-fach geladene Signal aus einer 40%igen TFE-Lösung wurde ein E50%-Wert von 29 eV ermittelt, für das gleiche Signal ohne TFE-Zusatz ein Wert von 36 eV (vgl. Tabelle 8). Dies bewies, dass teilentfaltete Zustände nicht nur durch das Vorhandensein einer bimodalen Ladungsverteilung angezeigt werden können. Erst durch die Ermittlung der Stabilitätswerte mittels CID wurde deutlich, dass sich selbst gleichbleibende Signale in den verschiedenen Lösemittelzusammensetzungen unterschiedlich verhalten können. Außerdem wies die Veränderung des 9-fach geladenen holo-Myoglobin-Komplexes, welche sich im Laufe der TFE-Titration einstellte, auf das Vorliegen verschiedener *Molten Globules*-Zustände bei den unterschiedlichen TFE-Konzentrationen hin. Die Entfaltung der Tertiärstruktur schreitet demnach mit zunehmender TFE-Konzentration kontinuierlich voran, wie dies anhand der E50%-Werte ersichtlich wurde.

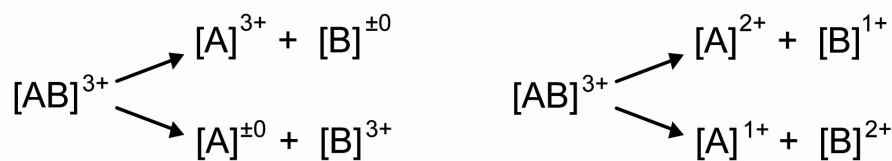
Durch diese unterschiedlichen Studien konnte die massenspektrometrische Analyse verschiedenster Komplexarten durchgeführt werden. Geeignete Versuchsbedingungen ermöglichten hierbei mit Hilfe der Massenspektrometrie nicht nur die Unterscheidung von spezifischen und unspezifischen Komplexen, sondern auch die Untersuchung von nativen und entfalteten Proteinzuständen. CID-Messungen vervollständigten diese Analysen, wobei herausgefunden werden konnte, dass nicht nur das Vorliegen einer bimodalen Ladungsverteilung auf unterschiedlich gefaltete Proteinstrukturen hindeutet. So können auch gleichgeladene Komplexe in verschiedenen Lösemittelzusammensetzungen unterschiedliche Faltungszustände und dadurch bedingt unterschiedliche Stabilitäten aufweisen. Eine Untersuchung mittels CID ist somit unumgänglich, wenn Protein-Ligand-Komplexe in verschiedenen Bedingungen miteinander verglichen werden sollen.

### 5.3 Gas-Phasen-Basizitäten

Kollisions-induzierte Messungen liefern, wie im vorangegangenen Abschnitt ersichtlich wurde, nicht nur Informationen zu Stabilitäten, sondern geben außerdem Aufschluss über Faltungszustände, oder wie in diesem Kapitel diskutiert werden soll, über die Basizitäten von Peptiden.

Die Dissoziationen verschiedener PNA-Hetero-Dimere lieferten unterschiedliche Fragmentierungsmuster, wofür variable Basizitäten bzw. Protonenaffinitäten der Peptidnukleinsäuren verantwortlich sein können. Die Detektion von Homo- und Hetero-Dimeren erfolgte im Massenspektrum durch entsprechende, 3-fach geladene Signale. Nach der Dissoziation der Dimere mussten sich auf die entstehenden Monomere insgesamt 3 Ladungen aufteilen. Hierfür

gibt es verschiedene Möglichkeiten, welche in den Schemata in Abb. 74 dargestellt sind. Ausgehend von einem Hetero-Dimer  $[AB]^{3+}$  lassen sich die Ladungen zum Beispiel so aufteilen, dass ein Interaktionspartner alle Ladungen erhält, der Andere keine. Werden die Ladungen auf beide Monomere aufgeteilt, trägt ein Monomer nach der Fragmentierung zwei Ladungen und das andere Monomer die verbleibende, letzte Ladung. Welche Ladungsverteilung durch die Dissoziation eingeleitet wird, hängt von der Protonenaffinität der beiden Monomere ab. Sind diese gleich, so entstehen  $[A]^{3+}$  und  $[B]^{3+}$  bzw.  $[A]^{2+}$  und  $[B]^{2+}$  sowie die dazugehörigen  $[A]^{1+}$ - und  $[B]^{1+}$ -Monomere im Verhältnis 1:1. Besitzt eines der Monomere eine höhere Protonenaffinität als das Andere, so sind die Protonen bevorzugt an diesem Monomer zu detektieren. Das Verhältnis der Monomersignalintensitäten gleicher Ladungszustände weicht dann vom 1:1-Verhältnis ab.



**Abb. 74:** Schematische Darstellung der Ladungsverteilung nach der Dissoziation eines 3-fach geladenen Hetero-Dimers.

Für die Hetero-Dimere der PNAs konnten unterschiedliche Monomer-Verhältnisse detektiert werden, was auf unterschiedliche Protonenaffinitäten der Peptide rückschließen ließ. Da sich die Peptidnukleinsäuren zum Teil aus unterschiedlichen Nucleobasen aufbauen, wurde das Monomer-Verhältnis zunächst mit den Einzelbasizitäten der Nucleobasen in Verbindung gebracht. In der Literatur findet man folgende Reihenfolge der Basizitäten: Guanin > Cytosin > Adenin >> Thymin [118]. Lassen sich die Gesamtbasizitäten der PNAs aus den Einzelbasizitäten der Nucleobasen berechnen, müssten die Monomere ACTA und ATCA aufgrund gleicher Nucleobasen gleiche Basizitäten besitzen. Die Hetero-Dimere [(TAGT)(ACTA)] (1) und [(TAGT) (ATCA)] (6) müssten dann nach der Dissoziation ein gleiches Monomer-Verhältnis aufweisen. Dies war jedoch nicht der Fall (vgl. Abb. 68 a und c). Während sich für das erst genannte Hetero-Dimer ein 1:1-Verhältnis der 2-fach geladenen Monomere detektieren ließ, betrug das Intensitätsverhältnis der 2-fach geladenen Monomere für das zweite Hetero-Dimer 9:1. Die Basizitäten der PNAs konnten sich demnach nicht einfach aus der Summe der Einzelbasizitäten zusammensetzen. Daher musste auch die Reihenfolge der Nucleobasen in der Aminosäuresequenz berücksichtigt werden.

In der Literatur sind Fragmentierungen von Oligodeoxynucleotiden bekannt, welche durch den CID-Mechanismus einen Verlust einer kovalent gebundenen, neutralen Base verzeichnen [132]. Dieser Basenverlust ist zum Einen von der Protonenaffinität der Nucleobasen abhängig, zum Anderen von der Position der Basen in der Nucleotidsequenz. Die Forschungsgruppe fand heraus, dass die Abspaltung der neutralen und damit protonierten Basen bevorzugt am 5'-Ende, dann am 3'-Ende und erst später in einer mittleren Position erfolgte [132]. Ob sich auch die verschiedenen Monomer-

Verhältnisse der PNAs anhand dieser Protonenaffinitätsregeln erklären lassen, wurde mit Hilfe der CID-Produktspektren überprüft. Die Monomer-Verhältnisse ließen sich in drei verschiedene Gruppen einteilen (vgl. Tabelle 14). Dabei stellte sich heraus, dass sich die Basizitäten der hier untersuchten Peptidnukleinsäuren im Allgemeinen am Vorhandensein eines Guanins oder Cytosins und deren Positionen in der PNA-Sequenz einordnen ließen. Adenin und Thymin wurden aufgrund ihrer geringeren Basizität und ihrer Anwesenheit in allen hier untersuchten PNAs vernachlässigt. Die Gesamtbasizität der PNAs ermittelt sich daher aus der Basizität einer oder maximal zweier Nukleinbasen. Generell sind PNAs, in denen ein Guanin enthalten ist, wie bei TGAT oder TAGT protonenaffiner als Peptide, in denen Cytosin enthalten ist (ACTA oder ATCA). Die Reihenfolge der Basizitäten ließ sich wie folgt eingliedern: TGAT > ACTA > ATCA.

ACTA und ATCA wiesen eine unterschiedliche Basizität auf, was auf die unterschiedliche Anordnung der Nukleobasen in der Aminosäuresequenz zurückgeführt werden könnte. Das Cytosin ist in beiden PNAs die protonenaffinste Nukleobase, an der sich die Gesamtbasizität orientiert. Im ACTA-Peptid ist das Cytosin näher am N-Terminus lokalisiert und begünstigt dadurch die Basizität des Peptids. Die Position entspricht somit dem 5'-Ende der DNA-Moleküle [132]. Das Cytosin in ATCA ist näher am C-Terminus lokalisiert, was die niedrigere Basizität des Peptids ausmacht. Ähnliches äußert sich auch für TGAT > TAGT.

Des Weiteren lässt sich TAGT mit ACTA gleichsetzen, wodurch klar wird, dass ein Guanin nahe dem C-Terminus eine vergleichbare Protonenaffinität besitzt, wie ein Cytosin nahe dem N-Terminus. Eine klare Präferenz zur Protonenanlagerung lässt sich somit bei den PNAs für das N-terminale Ende erkennen. Sind sowohl Cytosin als auch Guanin in der Peptidsequenz enthalten, wie dies beim ACGT der Fall ist, so wirken die beiden Basizitäten des Cytosins und des Guanins synergetisch, weshalb die Protonen bevorzugt auf diesem Peptid verbleiben.

Anhand der verschiedenen, mittels CID detektierten Monomer-Verhältnisse konnten einfache Regeln aufgestellt werden, welche einen Basizitätsvergleich verschiedener PNAs zulassen. Eine ähnliche Studie unter Einbeziehung der entstehenden Monomer-Verhältnisse wurde bereits 1991 von Cooks *et al.* durchgeführt [133]. Bei dieser Arbeit wurden verschiedene, niedermolekulare, zyklische Moleküle untersucht und deren Basizitäten anhand von Molekülen bekannter Basizität berechnet. Dies geschah ebenfalls über das Monomer-Verhältnis, welches aus der Dissoziation eines Dimers entstand.

In der hier durchgeführten Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich kollisions-induzierte Messungen nicht nur zur Bestimmung von Stabilitäten eignen, sondern auch zur Abschätzung von Protonenaffinitäten herangezogen werden können. Mit Hilfe einiger Regeln ließen sich die Gesamtbasizitäten der untersuchten Peptidnukleinsäuren vergleichen. Die aus der Literatur bekannte Reihenfolge der Einzelbasizitäten konnte in Bezug auf Guanin und Cytosin auch für die Nukleinbasen der PNAs nachgewiesen werden.

## 5.4 Flüssig-Phasen- und Gas-Phasen-Verhalten von Komplexen

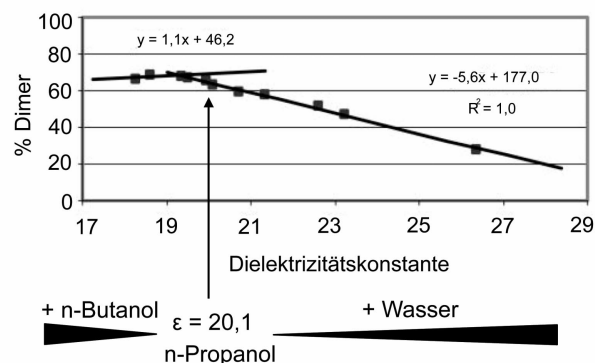
Herkömmliche Methoden zur Untersuchung von Peptid- und Protein-Interaktionen basieren meist auf Flüssig-Phasen-Techniken. Die Massenspektrometrie etablierte sich gerade im letzten Jahrzehnt zu einer wichtigen Methodik hinsichtlich der Charakterisierung von nichtkovalenten Komplexen. Da bei dieser Technik die zu untersuchenden Komplexe erst von der Flüssig- in die Gas-Phase transferiert werden müssen, kann nicht pauschal davon ausgegangen werden, dass alle Peptideigenschaften erhalten bleiben. Gerade das Lösemittel, welches in der Gas-Phase nicht mehr vorhanden ist, kann in der Flüssig-Phase z. B. aufgrund des hydrophoben Effekts die Oligomerisierung der Peptide unterstützen oder auslösen. Andere Wechselwirkungen hingegen können in der Gas-Phase verstärkt werden. So zum Beispiel die ionischen Wechselwirkungen, deren Stärke antiproportional mit der Dielektrizitätskonstante zusammenhängt (siehe Formel (1), Kapitel 1.1.3). Diese Konstante ist im Vakuum definitionsgemäß 1, während wässrige Lösemittel eine hohe Dielektrizitätskonstante aufweisen. Der Einfluss der Dielektrizitätskonstante wurde mit Hilfe der VSV-Peptide untersucht. Korrelationen zwischen Flüssig-Phasen-Ergebnissen und Gas-Phasen-Ergebnissen zeigten, dass im Falle der VSV-Peptide einige Eigenschaften in beiden Phasen nachweislich erhalten bleiben.

### 5.4.1 Peptideigenschaften

Die in Kapitel 4.3.1.3 dargestellte Korrelation zwischen der Helikalität und der Dimerisierung von Peptiden lieferte Hinweise auf ähnliche Peptideigenschaften in der Flüssig- und in der Gas-Phase. Während die Helikalität der Peptide mit Hilfe einer Flüssig-Phasen-Technik ermittelt wurde, konnten die Oligomeranteile mittels massenspektrometrischer Gas-Phasen-Untersuchungen analysiert werden. Die hierzu durchgeführte TFE-Titration zeigte sowohl für die Helikalität als auch für die Oligomerisierung einen Anstieg mit zunehmendem TFE-Gehalt. Beide Peptideigenschaften stagnierten ab einer TFE-Konzentration von 40%. Eine Erklärung hierfür lieferten Röntgenkleinwinkelstreuungs-Analysen, welche die Eigenschaften des Lösemittels untersuchten. Hong *et al.* sowie Kuprin *et al.* stellten fest, dass sich in TFE-Wasser-Mischungen die TFE-Moleküle zu Clustern zusammenlagern, um ihre Interaktionsfläche mit dem Wasser zu verringern [84, 134]. Hydrophobe Kohlenwasserstoffe und Halogengruppen sind im Inneren der Cluster lokalisiert und verdrängen teilweise das Wasser von der Peptidoberfläche [84]. Denkbar ist auch eine Beteiligung der Peptide an der Aggregation der TFE-Moleküle. Dies führt zu einer Stärkung der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen der Peptide und zu einer Stabilisierung der Sekundärstruktur. Hong postulierte zudem eine Zerstörung der TFE-Cluster bei einer TFE-Konzentration von 30-40%, da zur Separierung der Cluster ein bestimmter Wasseranteil benötigt wird. Die bis dahin erhaltene Struktur bleibt danach trotz der Zerstörung der TFE-Cluster erhalten (siehe Abb. 22).

Beim Übertritt von der Flüssig-Phase in die Gas-Phase verlieren die Ionen ihre Solvathülle, wodurch die TFE-Einflüsse aufgrund nicht mehr vorhandener TFE-Moleküle verloren gehen können. Die Abhängigkeit vom TFE-Gehalt machte sich auch bei der Oligomerisierung der Peptide bemerkbar, was darauf schließen ließ, dass die Sekundärstruktur, welche sich in der Flüssig-Phase ausgebildet hatte, auch in der Gas-Phase erhalten blieb. Hätte die Flüssig-Phasen-Struktur keinen Einfluss auf die Gas-Phasen-Oligomerisierung, so wäre der Dimeranteil bei jeder TFE-Konzentration gleich und würde nicht mit der TFE-abhängigen Sekundärstruktur korrelieren. Kaltashov *et al.* postulierten aufgrund von MIKE- (*mass analysed ion kinetic energy*) Untersuchungen, dass die helikale Struktur von Peptiden in der Gas-Phase erhalten bleibt [135]. Russell zeigte mit Hilfe der Ionenmobilitätsspektrometrie ebenfalls den Erhalt der helikalen Struktur in der Gas-Phase [136, 137]. Aus diesem Grund ist die Wahl des Lösemittels auch für Gas-Phasen-Analysen von entscheidender Bedeutung. Nur strukturinduzierende Lösemittel wie zum Beispiel TFE bewirken die Ausbildung der korrekten Sekundärstruktur in der Flüssig-Phase und ermöglichen die Detektion eines hohen Oligomeranteils in der Gas-Phase. Die in dieser Arbeit aufgestellte Korrelation zwischen der Helikalität und der Oligomerisierung der VSV-Peptide bestätigte diesen Sachverhalt.

Gross *et al.* brachten die zunehmende Oligomerisierung in unterschiedlichen Lösemittelzusammensetzungen nicht mit der Sekundärstruktur, sondern mit der variablen Dielektrizitätskonstante ( $\epsilon$ ) des Mediums in Verbindung. In dem von ihnen untersuchten  $\epsilon$ -Bereich konnte ab  $\epsilon = 19$  eine Abnahme der Oligomerisierung mit zunehmender Dielektrizitätskonstante beobachtet werden. Im unteren  $\epsilon$ -Bereich wurde eine leichte Zunahme der Oligomerisierung mit steigender Dielektrizitätskonstante detektiert (Abb. 75).



**Abb. 75: Oligomerisierung von Gramicidin in der Gas-Phase bei unterschiedlichen Dielektrizitätskonstanten.** Abbildung bearbeitet nach [89].

Die in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführte TFE-Studie zeigte eine ähnliche Korrelation. Der Dielektrizitätskonstantenbereich lag aufgrund der verwendeten TFE-Wasser-Mischung mit  $\epsilon_{\text{TFE}} = 26$  und  $\epsilon_{\text{H}_2\text{O}} = 79$  in einem Bereich zwischen 35 und 71. Die indirekte Proportionalität

zwischen der Oligomerisierung und der Dielektrizitätskonstante konnte trotz des höheren  $\epsilon$ -Bereichs bestätigt werden. Die Korrelation zwischen der Dimerisierung und der Dielektrizitätskonstante wies jedoch eine schlechtere Güte auf als die Korrelation mit der Helikalität. Dies konnte mit der Abflachung des Dimeranteils ab einer TFE-Konzentration von 40% bzw. 60% erklärt werden, während die Dielektrizitätskonstante der verwendeten Lösemittel kontinuierlich anstieg. Aufgrund der besseren Korrelation zwischen der Oligomerisierung und der Helikalität wurde die Faltung der Helices als ein wichtiges Kriterium für die Oligomerisierung nachgewiesen, welche durch die Wahl des Lösemittels entscheidend beeinflusst werden kann. Dies konnte auch im Rahmen der Praktikumsarbeit von Johanna Lampe für Gramacidin-Dimere gezeigt werden [138]. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Lösemittel mit verschiedenen Dielektrizitätskonstanten ausgewählt und der Dimeranteil des Gramacidins bestimmt. Ein Zusammenhang zwischen den Dielektrizitätskonstanten und den detektierbaren Dimeren konnte dabei nicht gefunden werden (Tabelle 17). Vielmehr beeinflusste die Wahl des Lösemittels die Oligomerisierung des Peptids.

**Tabelle 17: Gramacidin-Dimeranteile in verschiedenen Lösemitteln.**

Lösemittel	Butanol	Isopropanol	Ethanol	TFE
$\epsilon$	17,5	19,9	24,6	26,5
% Dimer	6,2	5,5	15,8	5,2

Bei genauer Betrachtung ist dieser Effekt auch für die von Gross publizierte Korrelation zu beobachten. Um einen Dielektrizitätskonstantenbereich von 18 bis 26 abzudecken, wurden zwei verschiedene Lösemittelmischungen verwendet. Für den unteren Bereich wurden Mischungen aus n-Propanol und n-Butanol verwendet, für den höheren Bereich Mischungen aus n-Propanol und Wasser. Der Knick in der Korrelation befindet sich genau beim Übergang von der einen Mischung zur Anderen, weshalb auch hier die Art des Lösemittels eine entscheidende Rolle spielte.

Die aufgestellte Korrelation zwischen der Sekundärstruktur, einer Flüssig-Phasen-Eigenschaft und der Oligomerisierung einer Gas-Phasen-Eigenschaft zeigte, dass die Faltung der Peptide auch nach dem Transfer in die Gas-Phase erhalten bleibt. Obwohl die Faltung der Peptide von der Solvathülle vorgegeben wird, welche in der Gas-Phase nicht mehr vorhanden ist, bleibt die Peptidstruktur in der Gas-Phase stabil. Sie stellt außerdem ein wichtiges Kriterium für die Oligomerisierung der Peptide dar. Flüssig-Phasen-Eigenschaften bzw. Zustände beeinflussen somit maßgeblich die Gas-Phasen-Detektion der Peptide.

## 5.4.2 Komplexstabilitäten

Wie im vorangegangenen Kapitel diskutiert, können sich gewisse Proteineigenschaften in der Flüssig-Phase anders verhalten als in der Gas-Phase. Dass die Faltung bzw. die Sekundärstruktur auch nach dem Transfer in die Gas-Phase erhalten bleibt und daher ein wichtiges Kriterium für die Ausbildung von Oligomeren darstellt, wurde bereits gezeigt. Besonders wichtig ist es außerdem zu untersuchen, ob Gas-Phasen-Stabilitäten, welche sich über CID-Messungen erhalten lassen, den Dissoziations- oder Assoziationsenergien aus Flüssig-Phasen-Messungen entsprechen. In der Einleitung wurde bereits erwähnt, dass sich die hier untersuchten, nichtkovalenten Wechselwirkungen stark von der Dielektrizitätskonstante des umgebenden Mediums beeinflussen lassen. Insbesondere ionische Wechselwirkungen werden in der Gas-Phase nahezu um einen Faktor 80 stabilisiert. Auch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen erhalten einen stabilisierenden Beitrag, wenn sie aus polaren Lösemitteln in die Gas-Phase transferiert werden. Dies geht darauf zurück, dass intermolekulare Wasserstoffbrücken zwischen Protein und dem Lösemittel in der Gas-Phase verloren gehen, wodurch intramolekulare Interaktionen der Komplexe stabilisiert werden. Hydrophobe Wechselwirkungen hingegen werden eher geschwächt. In einem polaren Lösemittel lagern sich hydrophobe Peptide zusammen, um den Kontakt zum umgebenden Lösemittel zu minimieren. Dieser hydrophobe Effekt hat zur Folge, dass sich, bedingt durch die Aggregation, eine Vielzahl von hydrophoben Kontakten ausbilden, welche die hydrophoben Wechselwirkungen verstärken. Fehlt die Solvathülle, so wird auch der hydrophobe Effekt nicht ausgelöst – dadurch verringert sich der Stabilitätsbeitrag der hydrophoben Wechselwirkungen. In der Literatur gibt es viele Publikationen, welche Korrelationen zwischen Gas- und Flüssig-Phasen-Stabilitäten aufzeigen konnten. Gerade für Häm-Komplexe wie Myoglobin, Hämoglobin oder Cytochrom b5 ließen sich übereinstimmende Energien in beiden Phasen nachweisen [139]. Andererseits sind mehrere Experimente bekannt, welche keine direkte Korrelation zwischen den Gas- und Flüssig-Phasen-Dissoziationsenergien bestätigen konnten. Darunter fallen die von Henion untersuchten Komplexe zwischen dem FKBP-Rezeptorprotein und Rapamycin [140].

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Komplexstabilitäten einer breiten Palette von Peptiden und Proteinen mittels CID untersucht. Durch eine anschließende Energienormierung ließen sich Dissoziationsenergien erhalten, welche mit Literaturdaten verglichen werden konnten. Da sich die untersuchten Systeme sowohl in ihrer Größe als auch in ihren Interaktionseigenschaften unterscheiden, sollten Grenzen und Möglichkeiten ermittelt werden, um Gas- und Flüssig-Phasen-Stabilitäten zu vergleichen.

### 5.4.2.1 Energienormierung

E50%-Werte, wie sie aus den CID-Messungen erhalten werden, ermöglichten bereits eine Abschätzung der Komplexstabilitäten. So lagen die mittleren Stabilitäten der 3-fach geladenen



VSV-Dimere mit 16,5 eV und die der PNA-Oligomere ebenfalls mit 16,5 eV im unteren Stabilitätsbereich, während zum Beispiel der 8-fach geladene  $\alpha$ -Hämoglobin-Komplex mit 24 eV eine höhere Stabilität aufwies. Myoglobin besaß mit 40 eV die höchste Stabilität der untersuchten, nichtkovalenten Komplexe. Diese Reihenfolge korreliert mit der Stabilitätsreihenfolge aus Flüssig-Phasen-Messungen (Tabelle 18). Die Dissoziationsenergien von Glykophorin A und dem ACGT-Dimer besitzen mit -9,0 kcal/mol und -11,3 kcal/mol ähnliche Werte wie die E50%-Werte [37, 126], während die E50%-Werte der Häm-Komplexe um einiges höher sind als die in der Literatur gefundenen Dissoziationsenergien [141, 142].

**Tabelle 18: Gas- und Flüssig-Phasen-Stabilitätswerte für nichtkovalente Komplexe.**

	GpA	ACGT	holo- $\alpha$ -Hb	holo-Mb
E50% [eV]	16,5	16,6	24	40
Literaturwerte [kcal/mol]	-9,0 <sup>[126]</sup>	-11,3 <sup>[37]</sup>	-14,8 <sup>[142]</sup>	-18,9 <sup>[141]</sup>

Obwohl die Reihenfolge der Gas-Phasen-Stabilitäten denen der Flüssig-Phase entspricht, geben die E50%-Werte keine exakten Stabilitäten an. Der Einfluss vieler Peptideigenschaften auf die E50%-Werte, wie z. B. der Einfluss des Ladungszustandes und der Komplexmasse, erforderte die Durchführung einer Energienormierung. Die Einbeziehung der Ladung konnte durch eine einfache Multiplikation mit dem E50%-Wert durchgeführt werden, da die Beschleunigung der Komplexe bis zur Kollisionszelle proportional zum Ladungszustand ist. Damit die Ionen bis zur Kollisionszelle die gleichen Geschwindigkeiten erreichen, benötigen höher geladene Komplexe eine geringere Spannung als Komplexe in kleineren Ladungszuständen. Dies publizierten in ähnlicher Form auch Moulis *et al.* sowie Konishi und Feng [52, 143].

Die Normierung um die Masse bzw. die Form der Komplexe war nicht trivial. Die Form der Komplexe trägt im Wesentlichen zur Stoßanzahl zwischen den neutralen Argonmolekülen in der Kollisionszelle und dem Protein-Komplex bei. Je mehr Stöße zur Dissoziation benötigt werden, desto stabiler ist der Komplex. Die Anzahl der Stöße wird insbesondere durch das Volumen der Komplexe beeinflusst, weshalb es in der Energienormierung berücksichtigt werden musste. Dies geschah über die Berechnung des Stoßquerschnitts (Abb. 65). Zur Berechnung nach Formel (3) wurden die Radien der kollidierenden Teilchen benötigt. Der van-der-Waals-Radius von Argon war bekannt – die Dimensionen der zu untersuchenden Komplexsysteme konnten jedoch nur abgeschätzt werden. Für Myoglobin, Hämoglobin und Cytochrom C standen dafür NMR- bzw. Kristallstrukturen zur Verfügung, aus denen die Strukturdimensionen ausgelesen wurden [144-146]. Für Myoglobin wurden aus der pdb-Struktur (1WLA) folgende Abmessungen erhalten: 40 x 40 x 38 Å. Aus diesen errechnete sich ein mittlerer Radius von 19,7 Å und nach Formel (3) ein Stoßquerschnitt von 1'221 Å<sup>2</sup>. Mark und Douglas bestimmten mittels Energieverlustexperimenten den Stoßquerschnitt von Ferri-(III)-holo-Myoglobin unter Berücksichtigung variabler

Ladungszustände [147]. Die Stoßquerschnitte der Myoglobin-Komplexe nahmen dabei mit steigendem Ladungszustand zu und wurden für 5-fach bis 9-fach geladene Komplexe auf  $1'278 \pm 149$  und  $1'812 \pm 20 \text{ \AA}^2$  bestimmt. Bereits 1998 publizierten Douglas *et al.* für holo-Myoglobin-Komplexe Stoßquerschnitte, welche ebenfalls vom Ladungszustand abhängig waren. Eine zunehmende Coulomb-Abstoßung schien für die Vergrößerung des Stoßquerschnitts in Abhängigkeit der Ladungszustände verantwortlich zu sein [54]. Die mittels Energieverlust-experimenten erhaltenen Stoßquerschnitte sind gegenüber dem hier berechneten Stoßquerschnitt für das holo-Myoglobin höher, wobei der Stoßquerschnitt des 5-fach geladenen Komplexes mit  $1'278 \pm 149 \text{ \AA}^2$  sehr gut mit dem hier berechneten Stoßquerschnitt von  $1'221 \text{ \AA}^2$  (ohne Berücksichtigung einer Ladung) korreliert. Die Berechnung lieferte somit ähnliche Parameter wie die experimentell Bestimmten. Unberücksichtigt in der Berechnung bleibt weiterhin der Ladungszustand sowie eventuelle Entfaltungen, wie sie zum Teil für die Häm-Komplexe beobachtet wurden – insbesondere für das in der hier vorliegenden Arbeit durch die Verringerung des pH-Wertes erzeugte apo-Myoglobin. Für die Berechnung dieses Stoßquerschnitts wurden die Dimensionsparameter des holo-Myoglobins herangezogen, da weder eine Kristall- noch eine NMR-Struktur für das apo-Myoglobin bekannt waren. Der berechnete Stoßquerschnitt für das apo-Myoglobin ist somit ähnlich dem Stoßquerschnitt des holo-Myoglobins, obwohl in diesem Komplex die Interaktionen zwischen der Hämgruppe und dem Protein die kompakte Struktur des Proteins begünstigen. Der wirkliche Stoßquerschnitt für das apo-Protein ist daher größer als der Berechnete von  $1'221 \text{ \AA}^2$ . In der Literatur findet man unter Berücksichtigung des Ladungszustandes (8+ bis 21+) Parameter zwischen  $3'340$  und  $5'040 \text{ \AA}^2$  [111, 114].

Durch die alternative Berechnung des Stoßquerschnitts mit Formel (4) ließ sich zwar die Bestimmung der Moleküldimensionen umgehen, das Problem mit den Ladungszuständen und der möglichen Entfaltung der Proteinstruktur blieb jedoch bestehen. Eine genauere Bestimmung bzw. Berechnung der Stoßquerschnitte konnte mit den zur Verfügung stehenden Möglichkeiten nicht erfolgen, weshalb die Bestimmung der Stoßquerschnitte für alle Protein- und Peptid-Komplexe auf die gleiche Weise unter Anwendung beider Berechnungsmethoden durchgeführt wurde. Die erhaltenen Mittelwerte, welche sich lediglich um 10% unterschieden, wurden dann zur Energienormierung herangezogen.

Mit Hilfe der ermittelten Stoßquerschnitte war es möglich, die Anzahl der Kollisionen zu berechnen, welche zur Dissoziation der Komplexe führten. Die Anzahl der Stöße war von der Gasdichte in der Kollisionszelle abhängig. Sie wurde während aller CID-Messungen konstant gehalten, wobei der exakte Wert nicht genau definiert werden konnte. Hierzu hätte ein Manometer in die Kollisionszelle eingebaut werden müssen. Für die Berechnungen wurde ein Gasdruck von  $2 \times 10^{-3}$  mbar angenommen, welcher in etwa dem Gasdruck in der Kollisionszelle entspricht. Zur Bestimmung der Stoßanzahl wurde weiterhin die von den Komplexen in der Kollisionszelle zurückgelegte Wegstrecke benötigt, welche aufgrund nicht verfügbarer Herstellerinformationen ebenfalls nicht bestimmt werden konnte. Über Simulationen fanden Douglas *et al.* heraus, dass die Stöße in den

letzten 4 bis 5 cm der Kollisionszelle stattfinden [112]. Aus diesem Grund wurde für eine 18,5 cm lange Kollisionszelle eine Wegstrecke von 13,5 bis 18,5 cm angenommen, im Mittel also 16 cm. Dieser Wert wurde für die Berechnung der Stoßanzahl herangezogen.

Aufgrund dieser ungenauen Bestimmung der zurückgelegten Wegstrecke, dem Argongasdruck und dem Stoßquerschnitt wurde alternativ eine zweite Energieberechnung durchgeführt. In dieser wurde vorausgesetzt, dass lediglich ein Stoß zur Dissoziation der Komplexe ausreicht, wenn er nur effektiv genug ist. Aus diesem Grund konnte die Anzahl der Stöße, welche zuvor über die Wegstrecke, den Stoßquerschnitt und die Argongasdichte berechnet werden musste, auf 1 reduziert werden.

#### 5.4.2.2 Normierte Dissoziationsenergien

Mit Hilfe der Energienormierung konnten aus den E50%-Werten Dissoziationsenergien erhalten werden, welche einen Vergleich zwischen den Stabilitäten der Komplexe untereinander sowie Vergleiche zu Flüssig-Phasen-Literaturdaten ermöglichten. Die Stabilitätswerte für die Fragmentierung kovalenter Bindungen waren mit Werten von 1'375-1'760 kcal/mol um etwa ein 20-faches höher als bekannte Dissoziationsenergien. Aus diesem Grund wurde die zu Beginn getroffene Annahme, dass bei der Dissoziation die gesamte, kinetische Energie in innere Energie des Systems umgewandelt wird, angepasst. Gerechtfertigt wurde diese Normierung dadurch, dass eine Veränderung der Bindungsstärke für kovalente Bindungen in der Gas-Phase im Vergleich zur Flüssig-Phase nicht zu erwarten war. Mit einer Transfereffizienz von 5% ließen sich Dissoziationswerte um 75 kcal/mol erhalten, welche den Literaturwerten entsprachen.

Die Dissoziationsenergien der nichtkovalenten Komplexe wurden ebenfalls mit einer 5%igen Transfereffizienz berechnet und Literaturwerten gegenübergestellt (Tabelle 19). Für Myoglobin sowie für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Hämoglobin publizierten Hargrove *et al.* folgende Assoziationskonstanten:  $8 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ ,  $3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  und  $9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  [141, 142]. Diese konnten mit Formel (9) aus Kapitel 5.2.2 in Bindungsenergien umgerechnet werden. Für Myoglobin erhält man eine Bindungsenergie von 18,9 kcal/mol, für die Hämoglobin-Komplexe Energien von -14,8 kcal/mol und -14,0 kcal/mol. Die berechneten Gas-Phasen-Dissoziationsenergien sind mit Werten von 57,2 kcal/mol, 30,4 kcal/mol und 40,9 kcal/mol etwa doppelt so hoch. Außerdem sind die Dissoziationsenergien der beiden Hämoglobin-Komplexe in ihrer Reihenfolge vertauscht. Während die Flüssig-Phasen-Dissoziationsenergie von  $\alpha$ -Hämoglobin größer ist als die der  $\beta$ -Untereinheit, ist das  $\beta$ -Hämoglobin in der Gas-Phase der stabilere Komplex.

**Tabelle 19: Normierte Multi-Stoß-Dissoziationsenergien aus CID-Messungen nichtkovalenter Komplexe im Vergleich zu Bindungsenergien der Flüssig-Phase.**

	$\Delta E_{\text{int}} (5\%)$ [kcal/mol]	$\Delta G^\circ$ [kcal/mol]
Myoglobin	57,2	-18,9 <sup>[141]</sup>
$\alpha$ -Hämoglobin	30,4	-14,8 <sup>[142]</sup>
$\beta$ -Hämoglobin	40,9	-14,0 <sup>[142]</sup>
Glykophorin A-Dimer	11,1	-9,0 <sup>[126]</sup>
ACGT-Dimer	10,6	-11,9 <sup>[37]</sup>
Cyt b <sup>1559</sup> -Dimer	16,6	

Die Gegenüberstellung der Gas- und Flüssig-Phasen-Stabilitäten zeigte mit Ausnahme des  $\beta$ -Hämoglobins eine in beiden Phasen identische Reihenfolge der Stabilitäten. Während die Stabilitätswerte der niedermolekularen Komplexe wie das Glykophorin A- und das ACGT-Dimer in beiden Phasen ähnlich sind, weichen die Dissoziationsenergien der höhermolekularen Komplexe stärker von den Bindungsenergien ab. Diese Abweichungen könnten auf die Anwesenheit von ionischen Wechselwirkungen zurückgeführt werden, welche aufgrund der kleinen Dissoziationskonstante des Vakuums verstärkt werden. Sowohl der Myoglobin- als auch der Hämoglobin-Komplex verfügt über eine geladene Salzbrücke, welche sich zwischen der Propiongruppe des Häms und einem Lysin der Polypeptidkette ausbildet [117, 148]. Diese Bindung könnte für die erhöhte Stabilität in der Gas-Phase verantwortlich sein. Dennoch ist der Unterschied zwischen Gas- und Flüssig-Phasen-Stabilität im Falle des Myoglobins stärker ausgeprägt als der Unterschied im Falle des Hämoglobins. Der Myoglobin-Komplex wird, wie in der Literatur beschrieben, zusätzlich zur Salzbrücke über ein weitverzweigtes Netz aus Wasserstoffbrücken stabilisiert, welche wiederum in der Gas-Phase verstärkt werden [117]. Auch in den Hämoglobin-Komplexen sind Wasserstoffbrücken an der Stabilisierung der Hämgruppe beteiligt – ein großes Netzwerk dieser Interaktionen besteht jedoch nicht. Dies erklärt die geringere Verstärkung der nichtkovalenten Interaktionen in der Gas-Phase.

Auffällig ist jedoch, dass sich nur die Wechselwirkungen der höhermolekularen Komplexe verstärkten. Das ACGT-Dimer wird ebenfalls hauptsächlich über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Dennoch erfährt es in der Gas-Phase keinen Stabilitätsgewinn. Gleiches gilt für Glykophorin. In diesen Oligomeren könnte der Stabilitätsgewinn, welcher aus den Wasserstoffbrückenbindungen erhalten wird, durch einen Stabilitätsverlust aufgrund des fehlenden hydrophoben Effekts in der Gas-Phase kompensiert worden sein.

Andererseits könnte auch die Energieberechnung für die niedermolekularen Komplexsysteme aufgrund der abgeschätzten Moleküldimensionen für die Unterschiede verantwortlich sein. Die Unsicherheitsfaktoren der Berechnung der Dissoziationsenergien ließen sich mit Hilfe der Ein-

Stoß-Energieberechnung umgehen. Die mit dieser Energienormierung erhaltenen Energiewerte sind in Tabelle 20 den Literaturwerten gegenübergestellt. Die berechneten Dissoziationswerte der nichtkovalenten Komplexe stimmen in diesem Fall für alle hier untersuchten Komplexe gut mit den Literaturwerten überein.

**Tabelle 20: Normierte Ein-Stoß-Dissoziationsenergien aus CID-Messungen nichtkovalenter Komplexe im Vergleich zu Bindungsenergien der Flüssig-Phase.**

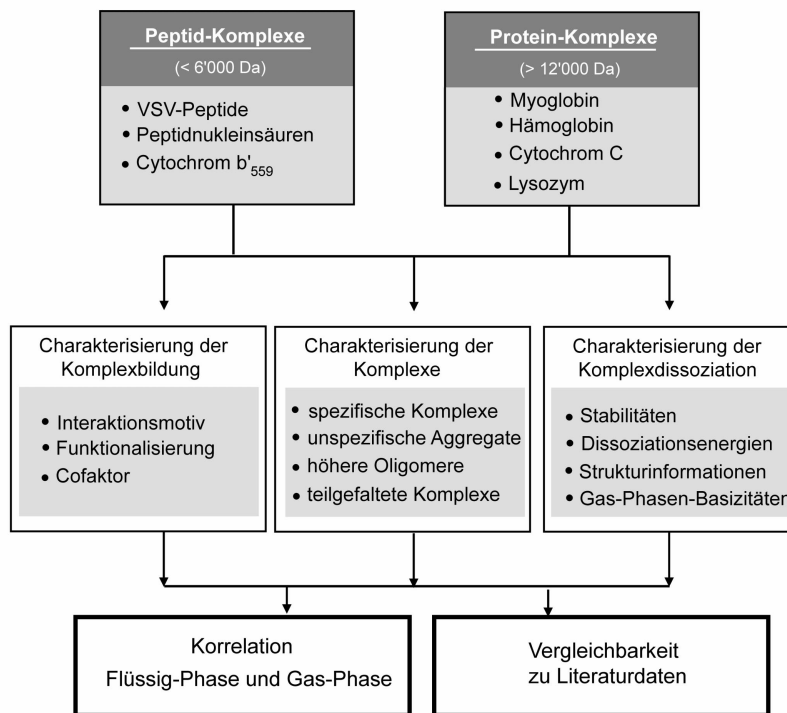
	$\Delta E_{\text{int}} (5\%)$ [kcal/mol]	$\Delta G^\circ$ [kcal/mol]
Myoglobin	16,7	-18,9 <sup>[141]</sup>
$\alpha$ -Hämoglobin	11,2	-14,8 <sup>[142]</sup>
$\beta$ -Hämoglobin	14,7	-14,0 <sup>[142]</sup>
Glykophorin A-Dimer	9,1	-9,0 <sup>[126]</sup>
ACGT-Dimer	12,1	-11,9 <sup>[37]</sup>
Cyt b <sub>559</sub> -Dimer	9,8	

Ein signifikanter Stabilitätsgewinn oder -verlust war für keinen der Komplexe zu beobachten. Die Vermutung, dass ionische Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen in der Gas-Phase gestärkt werden ließ sich durch die Ein-Stoß-Energieberechnung nicht nachweisen. Möglich wäre, dass die Wechselwirkungen, welche die Komplexe stabilisieren, aufgrund ihrer Lage innerhalb der Kontaktfläche vom Einfluss der Dielektrizitätskonstante des Vakuums abgeschirmt werden. In diesem Fall wären Gas- und Flüssig-Phasen-Stabilitäten einander ähnlich.

Die aus der Ein-Stoß-Berechnung erhaltenen Dissoziationswerte für die nichtkovalenten Komplexe zeigten im Vergleich zu den Flüssig-Phasen-Energiewerten eine bessere Übereinstimmung. Die Dissoziationsenergien der kovalenten Bindungen waren mit maximal 30 kcal/mol gegenüber den bekannten Bindungsenergien von etwa 80-100 kcal/mol zu gering. Dies lässt vermuten, dass ein einzelner Stoß zur Fragmentierung kovalenter Komplexe nicht ausreicht und diese Art der Energienormierung für die sehr stabilen, kovalenten Komplexe nicht tragbar ist. Zur Analyse dieser Bindungsstärken müssen daher andere Berechnungsmethoden zum Einsatz kommen, wie zum Beispiel die in dieser Arbeit durchgeführte Multi-Stoß-Energieberechnung.

## 5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche hoch- und niedermolekulare Peptid- und Protein-Komplexe massenspektrometrisch analysiert. Einen Überblick über die verwendeten Systeme und über die untersuchten Komplexeigenschaften gibt das Schema in Abb. 76 wieder.



**Abb. 76: Schematische Darstellung der verwendeten Komplexsysteme sowie der untersuchten Komplexeigenschaften.** Ziel der Arbeit war es, einen Vergleich zwischen Flüssig- und Gas-Phasen-Ergebnissen zu ermöglichen, um nichtkovalente Komplexe mittels massenspektrometrischer Analysen genauer untersuchen zu können.

Zu Beginn der Studien wurde die Bildung von Oligomeren charakterisiert. Dabei galt es zu untersuchen, ob gewisse Peptideigenschaften die Interaktionen zwischen den Peptiden steuern können und ob sich dadurch massenspektrometrisch unterschiedliche Oligomerisierungsanteile nachweisen lassen. Es zeigte sich, dass sowohl die Aminosäuresequenz als auch die Sekundärstruktur der Peptide die Ausbildung von Peptid-Peptid-Wechselwirkungen beeinflussen. Eine Korrelation zwischen der Helikalität der Peptide und ihrem Oligomeranteil wies darauf hin, dass die in der Flüssig-Phase bestimmte Sekundärstruktur auch nach dem Transfer in die Gas-Phase erhalten bleibt. Diese Erkenntnis ermöglicht den Einsatz der Massenspektrometrie als eine alternative Untersuchungsmethode nichtkovalenter Komplexe zu bereits etablierten Messtechniken.

Aufgrund der simultanen Detektion von intakten, nichtkovalenten Komplexen und frei vorliegenden Komplexbestandteilen ließ sich z. B. die Komplexbildung näher untersuchen. Faktoren, welche die Bildung der Komplexe auslösen oder inhibieren, sind durch den Einsatz der Massenspektrometrie leicht zu analysieren. Ein neuartiges Gradientensystem ermöglichte außerdem die Durchführung zeit- und materialsparender Studien, welche die Charakterisierung der Komplexbildung erleichterten. Das System trug unter anderem dazu bei, Affinitäten verschiedener Liganden zu ermitteln. Unter Verwendung variabler Versuchsbedingungen wie verschiedene

Ligandkonzentrationen konnten auf diese Weise auch unterschiedliche Arten von Protein-Ligand-Komplexen nachgewiesen und charakterisiert werden. Über die Signalintensitäten der Komplexe und über Gas-Phasen-Stabilitäten konnten z. B. Unterschiede zwischen spezifischen und unspezifischen Komplexen aufgezeigt werden. Mit Hilfe von Konzentrationsgradienten ließ sich die Bildung höherer Komplexe detailliert erfassen. Unter dem Einfluss verschiedener Lösemittel bzw. unterschiedlicher Denaturierungsreagenzien ließen sich außerdem simultan unterschiedlich gefaltete Protein-Komplexe detektieren. Dabei wurde gezeigt, dass die Anwesenheit verschieden gefalteter Zustände durch eine bimodale Ladungsverteilung der MS-Signale nachgewiesen werden kann. Mit Hilfe von kollisions-induzierten Messungen (CID) konnte weiterhin herausgefunden werden, dass auch die unter nativen Bedingungen detektierbaren Signale als teilentfaltete Komplexe, sogenannte *Molten Globules*, vorliegen können. Ihre ermittelte Stabilität war im Falle der nichtkovalenten Komplexe gegenüber der Stabilität nativer Komplexe verringert.

Die Bestimmung von Komplexstabilitäten umfasste einen weiteren Bereich dieser Arbeit. Insbesondere die Frage, ob sich die massenspektrometrischen Gas-Phasen-Stabilitäten, wie sie aus CID-Analysen erhalten wurden, mit den Ergebnissen aus der Flüssig-Phase vergleichen lassen, wurde adressiert. Um diesen Aspekt zu durchleuchten, wurden die aus diesen Messungen erhaltenen E50%-Werte über eine Energieberechnung auf Bindungsenergien normiert, welche sich mit Literaturwerten vergleichen ließen. Bindungsenergien, die sich aus der Ein-Stoß-Energieberechnung ergaben, zeigten dabei eindeutige Parallelen zu den Flüssig-Phasen-Bindungsenergien nichtkovalenter Komplexe. Stabilitätsunterschiede zwischen verschiedenen Komplexsystemen konnten eindeutig quantifiziert werden, weshalb die Bestimmung von Dissoziations- bzw. Bindungsenergien mit Hilfe der CID-Messungen erfolgen kann. Als Nachweisgrenze für den Einsatz der CID-Messungen konnten die geringen Stabilitätsunterschiede der niedermolekularen Peptid-Komplexe wie der VSV- und PNA-Komplexe eingeordnet werden. Als alternative Untersuchungsmethode ging die IRMPD-Technik hervor, mit welcher ansatzweise kleine Stabilitätsunterschiede zu erfassen waren.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse machen die variable Einsatzmöglichkeit der Massenspektrometrie bei der Untersuchung nichtkovalenter Protein- und Peptid-Komplexe deutlich. Biomolekulare Interaktionen wie Protein-Ligand-Wechselwirkungen oder auch Peptid-Peptid-Interaktionen sind an unzähligen, biologischen Prozessen beteiligt. Häufig werden durch die Ausbildung nichtkovalenter Komplexe Krankheiten wie z. B. die Alzheimer-Erkrankung hervorgerufen. Auch Signalkaskaden und enzymatische Reaktionen werden über nichtkovalente Protein-Komplexe reguliert. Dies macht die Charakterisierung der nichtkovalenten Komplexe zu einem wichtigen Forschungsbestandteil. Die hier angewandte Technik der Massenspektrometrie entwickelt sich durch den Einsatz geringer Probenvolumina und zeitsparender Messmethoden sicherlich zu einer zukunftssträchtigen Untersuchungsmethode für nichtkovalente Protein- und Peptid-Komplexe.

---

## Literaturverzeichnis

1. Chrisman PA, Newton KA, Reid GE, Wells JM, McLuckey SA: Loss of charged versus neutral heme from gaseous holomyoglobin ions. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2001, 15(23): 2334-2340.
2. Berggard T, Linse S, James P: Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics* 2007, 7(16): 2833-2842.
3. Nath KA, Grande JP, Haggard JJ, Croatt AJ, Katusic ZS, Solovey A, Hebbel RP: Oxidative stress and induction of heme oxygenase-1 in the kidney in sickle cell disease. *Am J Pathol* 2001, 158(3): 893-903.
4. Müller-Esterl W: Biochemie eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler, München: Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag; 2004.
5. Nelson D, Cox M: Lehninger Biochemie, Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 2001.
6. Petsk GA, Ringe D: Protein Structure and Function. London: Sinauer Associates Blackwell Publishing; 2004.
7. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Molecular biology of the cell, New York: Garland Science; 2002.
8. Zidek L, Novotny MV, Stone MJ: Increased protein backbone conformational entropy upon hydrophobic ligand binding. *Nat Struct Biol* 1999, 6(12): 1118-1121.
9. Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SGF, Thian FS, Kobilka TS, Choi H-J, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK *et al*: High-Resolution Crystal Structure of an Engineered Human 2-Adrenergic G Protein Coupled Receptor. *Science* 2007, 318(5854): 1258-1265.
10. Neduva V, Russell RB: Peptides mediating interaction networks: new leads at last. *Curr Opin Biotechnol* 2006, 17(5): 465-471.
11. Langosch D, Heringa J: Interaction of transmembrane helices by a knobs-into-holes packing characteristic of soluble coiled coils. *Proteins* 1998, 31(2): 150-159.
12. Ruan W, Becker V, Klingmuller U, Langosch D: The interface between self-assembling erythropoietin receptor transmembrane segments corresponds to a membrane-spanning leucine zipper. *J Biol Chem* 2004, 279(5): 3273-3279.
13. Russ WP, Engelman DM: The GxxxG motif: A framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol* 2000, 296(3):911-919.
14. Lemmon MA, Treutlein HR, Adams PD, Brunger AT, Engelman DM: A dimerization motif for transmembrane alpha-helices. *Nat Struct Biol* 1994, 1(3): 157-163.
15. MacKenzie KR, Prestegard JH, Engelman DM: A transmembrane helix dimer: structure and implications. *Science* 1997, 276(5309): 131-133.
16. Langosch D, Brosig B, Kolmar H, Fritz HJ: Dimerisation of the glycoporphin A transmembrane segment in membranes probed with the ToxR transcription activator. *J Mol Biol* 1996, 263(4): 525-530.
17. Russ WP, Engelman DM: TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96(3): 863-868.
18. Melnyk RA, Kim S, Curran AR, Engelman DM, Bowie JU, Deber CM: The affinity of GXXXG motifs in transmembrane helix-helix interactions is modulated by long-range communication. *J Biol Chem* 2004, 279(16): 16591-16597.
19. Fleming KG, Engelman DM: Specificity in transmembrane helix-helix interactions can define a hierarchy of stability for sequence variants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98(25): 14340-14344.



20. Fisher LE, Engelman DM, Sturgis JN: Detergents modulate dimerization, but not helicity, of the glycoporphin A transmembrane domain. *J Mol Biol* 1999, 293(3): 639-651.
21. Bu Z, Engelman DM: A method for determining transmembrane helix association and orientation in detergent micelles using small angle x-ray scattering. *Biophys J* 1999, 77(2): 1064-1073.
22. Schneider D, Engelman DM: Motifs of two small residues can assist but are not sufficient to mediate transmembrane helix interactions. *J Mol Biol* 2004, 343(4): 799-804.
23. Schneider D, Engelman DM: GALLEX, a measurement of heterologous association of transmembrane helices in a biological membrane. *J Biol Chem* 2003, 278(5): 3105-3111.
24. Smith SO, Eilers M, Song D, Crocker E, Ying W, Groesbeek M, Metz G, Ziliox M, Aimoto S: Implications of threonine hydrogen bonding in the glycoporphin A transmembrane helix dimer. *Biophys J* 2002, 82(5): 2476-2486.
25. Doura AK, Fleming KG: Complex interactions at the helix-helix interface stabilize the glycoporphin A transmembrane dimer. *J Mol Biol* 2004, 343(5):1487-1497.
26. Doura AK, Kobus FJ, Dubrovsky L, Hibbard E, Fleming KG: Sequence context modulates the stability of a GxxxG-mediated transmembrane helix-helix dimer. *J Mol Biol* 2004, 341(4): 991-998.
27. Bilsel PA, Nichol ST: Polymerase errors accumulating during natural evolution of the glycoprotein gene of vesicular stomatitis virus Indiana serotype isolates. *J Virol* 1990, 64(10): 4873-4883.
28. Rose JK, Gallione CJ: Nucleotide sequences of the mRNA's encoding the vesicular stomatitis virus G and M proteins determined from cDNA clones containing the complete coding regions. *J Virol* 1981, 39(2): 519-528.
29. Langosch D, Brosig B, Pipkorn R: Peptide mimics of the vesicular stomatitis virus G-protein transmembrane segment drive membrane fusion in vitro. *J Biol Chem* 2001, 276(34): 32016-32021.
30. Unterreitmeier S, Fuchs A, Schaffler T, Heym RG, Frishman D, Langosch D: Phenylalanine promotes interaction of transmembrane domains via GxxxG motifs. *J Mol Biol* 2007, 374(3): 705-718.
31. Munter LM, Voigt P, Harmeier A, Kaden D, Gottschalk KE, Weise C, Pipkorn R, Schaefer M, Langosch D, Multhaup G: GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. *Embo J* 2007, 26(6): 1702-1712.
32. Weggen S, Eriksen JL, Das P, Sagi SA, Wang R, Pietrzik CU, Findlay KA, Smith TE, Murphy MP, Bultter T *et al*: A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* 2001, 414(6860): 212-216.
33. Eriksen JL, Sagi SA, Smith TE, Weggen S, Das P, McLendon DC, Ozols VV, Jessing KW, Zavitz KH, Koo EH *et al*: NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target gamma-secretase and lower Abeta 42 in vivo. *J Clin Invest* 2003, 112(3): 440-449.
34. Kukar T, Murphy MP, Eriksen JL, Sagi SA, Weggen S, Smith TE, Ladd T, Khan MA, Kache R, Beard J *et al*: Diverse compounds mimic Alzheimer disease-causing mutations by augmenting Abeta42 production. *Nat Med* 2005, 11(5): 545-550.
35. Bohler C, Nielsen PE, Orgel LE: Template switching between PNA and RNA oligonucleotides. *Nature* 1995, 376(6541): 578-581.
36. Bruckner AM, Chakraborty P, Gellman SH, Diederichsen U: Molecular architecture with functionalized beta-peptide helices. *Angew Chem Int Ed Engl* 2003, 42(36): 4395-4399.
37. Chakraborty P, Diederichsen U: Three-dimensional organization of helices: design principles for nucleobase-functionalized beta-peptides. *Chemistry* 2005, 11(11): 3207-3216.
38. Rasmussen H, Kastrup JS, Nielsen JN, Nielsen JM, Nielsen PE: Crystal structure of a peptide nucleic acid (PNA) duplex at 1.7 Å resolution. *Nat Struct Mol Biol* 1997, 4(2): 98-101.

39. Petersson B, Nielsen BB, Rasmussen H, Larsen IK, Gajhede M, Nielsen PE, Kastrop JS: Crystal structure of a partly self-complementary peptide nucleic acid (PNA) oligomer showing a duplex-triplex network. *J Am Chem Soc* 2005, 127(5): 1424-1430.
40. Michelson AM: Hypochromicity of oligo- and polynucleotides. *Biochim Biophys Acta* 1962, 55: 841-848.
41. Wan KX, Gross ML, Shibue T: Gas-phase stability of double-stranded oligodeoxynucleotides and their noncovalent complexes with DNA-binding drugs as revealed by collisional activation in an ion trap. *J Am Soc Mass Spectrom* 2000, 11(5): 450-457.
42. Weiß A, Diederichsen U: Uniformly Nucleobase-Functionalized beta-Peptide Helices: Watson-Crick Pairing or Nonspecific Aggregation. *European J Org Chem* 2007, 2007(33): 5531-5539.
43. Chakraborty P, Brückner AM, Diederichsen U: Synthesis of a 7-Deazaguanine-Functionalized beta-Amino Acid: Improved Specificity of beta-Peptide Helix Organization. *European J Org Chem* 2006, 2006(10): 2410-2416.
44. Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O: Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 1991, 254(5037): 1497-1500.
45. Alotte C, Martin A, Caldarelli SA, Di Giorgio A, Condom R, Zoulim F, Durantel D, Hantz O: Short peptide nucleic acids (PNA) inhibit hepatitis C virus internal ribosome entry site (IRES) dependent translation in vitro. *Antiviral Res* 2008, 80(3): 280-287.
46. Babcock GT, Widger WR, Cramer WA, Oertling WA, Metz JG: Axial ligands of chloroplast cytochrome b-559: identification and requirement for a heme-cross-linked polypeptide structure. *Biochemistry* 1985, 24(14): 3638-3645.
47. McNamara VP, Sutterwala FS, Pakrasi HB, Whitmarsh J: Structural model of cytochrome b559 in photosystem II based on a mutant with genetically fused subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94(25): 14173-14178.
48. Francke C, Loyal R, Ohad I, Haehnel W: In vitro assembly of a beta2 cytochrome b559-like complex from the chemically synthesised beta-subunit encoded by the *Synechocystis* sp. 6803 psbF gene. *FEBS Lett* 1999, 442(1): 75-78.
49. Prodöhl A, Volkmer T, Finger C, Schneider D: Defining the Structural Basis for Assembly of a Transmembrane Cytochrome. *J Mol Biol* 2005, 350(4): 744-756.
50. Volkmer T, Becker C, Prodöhl A, Finger C, Schneider D: Assembly of a transmembrane b-type cytochrome is mainly driven by transmembrane helix interactions. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1758(11): 1815-1822.
51. Katta V, Chait BT: Observation of the heme-globin complex in native myoglobin by electrospray-ionization mass spectrometry. *J Am Chem Soc* 1991, 113(22): 8534-8535.
52. Konishi Y, Feng R: Conformational stability of heme proteins in vacuo. *Biochemistry* 1994, 33(32): 9706-9711.
53. Gross DS, Zhao Y, Williams ER: Dissociation of heme-globin complexes by blackbody infrared radiative dissociation: molecular specificity in the gas phase? *J Am Soc Mass Spectrom* 1997, 8(5): 519-524.
54. Chen YL, Campbell JM, Collings BA, Konermann L, Douglas DJ: Stability of a highly charged noncovalent complex in the gas phase: holomyoglobin. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1998, 12(15): 1003-1010.
55. Li YT, Hsieh YL, Henion JD, Ganem B: Studies on heme binding in myoglobin, hemoglobin, and cytochrome c by ion spray mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 1993, 4(8): 631-637.
56. Johnson LN: The early history of lysozyme. *Nat Struct Biol* 1998, 5(11): 942-944.
57. Blake CC, Koenig DF, Mair GA, North AC, Phillips DC, Sarma VR: Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. *Nature* 1965, 206(986): 757-761.

58. Blake CC, Johnson LN, Mair GA, North AC, Phillips DC, Sarma VR: Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1967, 167(9): 378-388.
59. Fukamizo T: Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application. *Curr Protein Pept Sci* 2000, 1(1): 105-124.
60. Dahlquist FW, Jao L, Raftery M: On the binding of chitin oligosaccharides to lysozyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1966, 56(1): 26-30.
61. Schindler M, Assaf Y, Sharon N, Chipman DM: Mechanism of lysozyme catalysis: role of ground-state strain in subsite D in hen egg-white and human lysozymes. *Biochemistry* 1977, 16(3): 423-431.
62. Denhart N, Letzel T: Mass spectrometric real-time monitoring of enzymatic glycosidic hydrolysis, enzymatic inhibition and enzyme complexes. *Anal Bioanal Chem* 2006, 386(3): 689-698.
63. Gross HJ: Mass Spectrometry. Berlin: Springer; 2008.
64. Langosch D, Brosig B, Kolmar H, Fritz H-J: Dimerisation of the Glycophorin A Transmembrane Segment in Membranes Probed with the ToxR Transcription Activator. *J Mol Biol* 1996, 263(4): 525-530.
65. Galla HJ: Spektroskopische Methoden in der Biochemie. Stuttgart: Thieme Verlag; 1988.
66. Gore MG: Spectrophotometry and Spectrofluorometry: A Practical Approach. New York, Oxford: University Press Inc; 2000.
67. Weicherding D: Synthese von Alanyl- und Homoalanyl-Peptidnucleinsäuren Untersuchungen der Homologie, der Wechselwirkungen mit Aminosäuren und des photoinduzierten Elektronentransfers. Dissertation. Technische Universität München; 2000.
68. Lottspeich F, Zorbas H: Bioanalytik. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag; 1998.
69. Greenfield NJ: Methods to Estimate the Conformation of Proteins and Polypeptides from Circular Dichroism Data. *Anal Biochem* 1996, 235(1): 1-10.
70. Brahm S, Brahm J: Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J Mol Biol* 1980, 138(2): 149-178.
71. Bohm G, Muhr R, Jaenicke R: Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng* 1992, 5(3): 191-195.
72. Poschner BC, Reed J, Langosch D, Hofmann MW: An automated application for deconvolution of circular dichroism spectra of small peptides. *Anal Biochem* 2007, 363(2): 306-308.
73. Lim H-K, Hsieh YL, Ganem B, Henion J: Recognition of cell-wall peptide ligands by vancomycin group antibiotics: Studies using ion spray mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 1995, 30(5): 708-714.
74. Scatchard G: The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1949, 51: 660-672.
75. Marzluff EM, Campbell S, Rodgers MT, Beauchamp JL: Collisional Activation of Large Molecules Is an Efficient Process. *J Am Chem Soc* 1994, 116(15): 6947-6948.
76. Przybylski M, Kast J, Glocker MO, Duerr E, Bosshard HR, Nock S, Sprinzl M: Mass Spectrometric Approaches to Molecular Characterization of Protein-Nucleic Acid Interactions. *Toxicol Lett* 1995, 82/83: 567-575.
77. Kulik V, Hartmann E, Weyand M, Frey M, Gierl A, Nicks D, Dunn MF, Schlichting I: On the Structural Basis of the Catalytic Mechanism and the Regulation of the Alpha Subunit of Tryptophan Synthase from *Salmonella typhimurium* and BX1 from Maize, Two Evolutionarily Related Enzymes. *J Mol Biol* 2005, 352(3): 608-620.
78. Frey M, Chomet P, Glawischnig E, Stettner C, Grun S, Winklmaier A, Eisenreich W, Bacher A, Meeley RB, Briggs SP *et al*: Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science* 1997, 277(5326): 696-699.

79. Frey M, Spiteller D, Boland W, Gierl A: Transcriptional activation of Igl, the gene for indole formation in *Zea mays*: a structure-activity study with elicitor-active N-acyl glutamines from insects. *Phytochemistry* 2004, 65(8): 1047-1055.
80. Frey M, Stettner C, Pare PW, Schmelz EA, Tumlinson JH, Gierl A: An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97(26): 14801-14806.
81. Kriechbaumer V, Weigang L, Fiesselmann A, Letzel T, Frey M, Gierl A, Glawischnig E: Characterisation of the tryptophan synthase alpha subunit in maize. *BMC Plant Biol* 2008, 8: 44.
82. Benesch JL, Ruotolo BT, Simmons DA, Robinson CV: Protein complexes in the gas phase: technology for structural genomics and proteomics. *Chem Rev* 2007, 107(8): 3544-3567.
83. Mühlberger L: Massenspektrometrische Studie der ionischen Wechselwirkungen zwischen polyanilinbasierenden Modellpeptiden, sowie der konzentrationsabhängigen Oligomerisierung anderer hydrophober Modellpeptide. *Diplomarbeit*. Freising: Technische Universität München; 2007.
84. Hong D-P, Hoshino M, Kuboi R, Goto Y: Clustering of Fluorine-Substituted Alcohols as Factor Responsible for Their Marked Effects on Proteins and Peptide. *J Am Chem Soc* 1999, 121: 8427-8433.
85. Lacroix E, Viguera AR, Serrano L: Elucidating the folding problem of alpha-helices: local motifs, long-range electrostatics, ionic-strength dependence and prediction of NMR parameters. *J Mol Biol* 1998, 284(1): 173-191.
86. Padmanabhan S, Marqusee S, Ridgeway T, Laue TM, Baldwin RL: Relative helix-forming tendencies of nonpolar amino acids. *Nature* 1990, 344(6263): 268-270.
87. Senes A, Ubarretxena-Belandia I, Engelman DM: The Calpha-H...O hydrogen bond: a determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98(16): 9056-9061.
88. Bärlocher F: Biostatistik - Praktische Einführung in Konzepte und Methoden. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1999.
89. Chitta RK, Gross ML: Electrospray ionization-mass spectrometry and tandem mass spectrometry reveal self-association and metal-ion binding of hydrophobic peptides: a study of the gramicidin dimer. *Biophys J* 2004, 86(1 Pt 1): 473-479.
90. Carneiro FA, Bianconi ML, Weissmuller G, Stauffer F, Da Poian AT: Membrane recognition by vesicular stomatitis virus involves enthalpy-driven protein-lipid interactions. *J Virol* 2002, 76(8): 3756-3764.
91. Carneiro FA, Lapido-Loureiro PA, Cordo SM, Stauffer F, Weissmuller G, Bianconi ML, Juliano MA, Juliano L, Bisch PM, Da Poian AT: Probing the interaction between vesicular stomatitis virus and phosphatidylserine. *Eur Biophys J* 2006, 35(2): 145-154.
92. Demmers JA, van Duijn E, Haverkamp J, Greathouse DV, Koeppe RE, 2nd, Heck AJ, Killian JA: Interfacial positioning and stability of transmembrane peptides in lipid bilayers studied by combining hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry. *J Biol Chem* 2001, 276(37): 34501-34508.
93. Demmers JA, van Dalen A, de Kruijff B, Heck AJ, Killian JA: Interaction of the K<sup>+</sup> channel KcsA with membrane phospholipids as studied by ESI mass spectrometry. *FEBS Lett* 2003, 541(1-3): 28-32.
94. Cheng RP, Gellman SH, DeGrado WF: beta-Peptides: from structure to function. *Chem Rev* 2001, 101(10): 3219-3232.
95. Arndt M, Brückner PCSHGUD: Molecular Architecture with Functionalized beta-Peptide Helices13. *Angew Chem Int Ed* 2003, 42(36): 4395-4399.
96. Stewart DH, Brudvig GW: Cytochrome b559 of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1998, 1367(1-3): 63-87.
97. Prodohl A, Volkmer T, Finger C, Schneider D: Defining the structural basis for assembly of a transmembrane cytochrome. *J Mol Biol* 2005, 350(4): 744-756.

98. Ferreira KN, Iverson TM, Maghlaoui K, Barber J, Iwata S: Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* 2004, 303(5665): 1831-1838.
99. Imoto T, Johnson LN, North ACT, Phillips DC, Rupley JA: The enzymes - Vertebrate lysozyme, New York; 1972.
100. Köllmeier T: Massenspektrometrische Untersuchung von nicht-kovalenten Komplexen (VSV-Peptid-Komplexe sowie Lysozym-Ligand-Komplexe) im offline- bzw. online System. *Diplomarbeit*. Freising: Technische Universität München; 2008.
101. Denhart N: Charakterisierung von Glykosidasen mittels Echtzeit Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie. *Dissertation*. Freising: Technische Universität München; 2008.
102. Cheetham JC, Artymiuk PJ, Phillips DC: Refinement of an enzyme complex with inhibitor bound at partial occupancy. Hen egg-white lysozyme and tri-N-acetylchitotriose at 1.75 Å resolution. *J Mol Biol* 1992, 224(3): 613-628.
103. Dickerson RE, Geis I: Hemoglobin. Menlo Park, California: Benjamin/Cummings Publishing Company; 1983.
104. Winston RL, Fitzgerald MC: Mass spectrometry as a readout of protein structure and function. *Mass Spectrom Rev* 1997, 16(4): 165-179.
105. Babu KR, Douglas DJ: Methanol-induced conformations of myoglobin at pH 4.0. *Biochemistry* 2000, 39(47): 14702-14710.
106. Konermann L, Douglas DJ: Acid-induced unfolding of cytochrome c at different methanol concentrations: electrospray ionization mass spectrometry specifically monitors changes in the tertiary structure. *Biochemistry* 1997, 36(40): 12296-12302.
107. Konermann L, Douglas DJ: Equilibrium unfolding of proteins monitored by electrospray ionization mass spectrometry: distinguishing two-state from multi-state transitions. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1998, 12(8): 435-442.
108. Shukla AK, Futrell JH: Tandem mass spectrometry: dissociation of ions by collisional activation. *J Mass Spectrom* 2000, 35(9): 1069-1090.
109. Dickerson RE, Takano T, Eisenberg D, Kallai OB, Samson L, Cooper A, Margoliash E: Ferricytochrome c. I. General features of the horse and bonito proteins at 2.8 Å resolution. *J Biol Chem* 1971, 246(5): 1511-1535.
110. Kaufman SL, Kuchumov AR, Kazakevich M, Vinogradov SN: Analysis of a 3.6-MDa hexagonal bilayer hemoglobin from *Lumbricus terrestris* using a gas-phase electrophoretic mobility molecular analyzer. *Anal Biochem* 1998, 259(2): 195-202.
111. Gill AC, Jennings KR, Wyttenbach T, Bowers MT: Conformations of biopolymers in the gas phase: a new mass spectrometric method. *Int J Mass Spectrom* 2000, 195-196: 685-697.
112. Mauk MR, Mauk AG, Chen YL, Douglas DJ: Tandem mass spectrometry of protein-protein complexes: cytochrome c-cytochrome b5. *J Am Soc Mass Spectrom* 2002, 13(1): 59-71.
113. Atkins P: *Physikalische Chemie*, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo: VCH 1999.
114. Covey T, Douglas DJ: Collision cross sections for protein ions. *J Am Soc Mass Spectrom* 1993, 4(8): 616-623.
115. Chen Y-L, Collings BA, Douglas DJ: Collision cross sections of myoglobin and cytochrome c ions with Ne, Ar, and Kr. *J Am Soc Mass Spectrom* 1997, 8(7): 681-687.
116. Evans SV, Brayer GD: High-resolution study of the three-dimensional structure of horse heart metmyoglobin. *J Mol Biol* 1990, 213(4): 885-897.
117. Hunter CL, Lloyd E, Eltis LD, Rafferty SP, Lee H, Smith M, Mauk AG: Role of the heme propionates in the interaction of heme with apomyoglobin and apocytochrome b5. *Biochemistry* 1997, 36(5): 1010-1017.
118. Russo N, Toscano M, Grand A, Jolibois F: Protonation of thymine, cytosine, adenine, and guanine DNA nucleic acid bases: Theoretical investigation into the framework of density functional theory. *J Comput Chem* 1998, 19(9): 989-1000.

119. Senes A, Gerstein M, Engelman DM: Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *J Mol Biol* 2000, 296(3): 921-936.
120. Scheiner S, Kar T, Gu Y: Strength of the Calpha H...O hydrogen bond of amino acid residues. *J Biol Chem* 2001, 276(13): 9832-9837.
121. Vargas R, Garza J, Dixon DA, Hay BP: How Strong Is the C $\alpha$ -H...O=C Hydrogen Bond? *J Am Chem Soc* 2000, 122(19): 4750-4755.
122. MacKenzie KR, Engelman DM: Structure-based prediction of the stability of transmembrane helix-helix interactions: the sequence dependence of glycoporphin A dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(7): 3583-3590.
123. Kleiger G, Grothe R, Mallick P, Eisenberg D: GXXXG and AXXXA: common alpha-helical interaction motifs in proteins, particularly in extremophiles. *Biochemistry* 2002, 41(19): 5990-5997.
124. Lemmon MA, Flanagan JM, Treutlein HR, Zhang J, Engelman DM: Sequence specificity in the dimerization of transmembrane alpha-helices. *Biochemistry* 1992, 31(51): 12719-12725.
125. Diezemann N, Weigang LMM, Chakraborty P, Frauendorf H, Letzel T, Diederichsen U: Organization of nucleobase-functionalized beta-peptides investigated by soft electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2009 Jan 26. online verfügbar
126. Fleming KG, Ackerman AL, Engelman DM: The effect of point mutations on the free energy of transmembrane alpha-helix dimerization. *J Mol Biol* 1997, 272(2): 266-275.
127. Fleming KG: Standardizing the free energy change of transmembrane helix-helix interactions. *J Mol Biol* 2002, 323(3): 563-571.
128. Yang Z: Mass Spectrometric Study of Lysozyme Complexes using Continuous-Flow Enzymatic Assays. *Diplomarbeit*. Freising: Technische Universität München; 2007.
129. Veros CT, Oldham NJ: Quantitative determination of lysozyme-ligand binding in the solution and gas phases by electrospray ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007, 21(21): 3505-3510.
130. Loo JA, Edmonds CG, Udseth HR, Smith RD: Effect of reducing disulfide-containing proteins on electrospray ionization mass spectra. *Anal Chem* 1990, 62(7): 693-698.
131. Chowdhury SK, Katta V, Chait BT: Probing conformational changes in proteins by mass spectrometry. *J Am Chem Soc* 1990, 112(24): 9012-9013.
132. Vrkic AK, O'Hair RAJ, Foote S, Reid GE: Fragmentation reactions of all 64 protonated trimer oligodeoxynucleotides and 16 mixed base tetramer oligodeoxynucleotides via tandem mass spectrometry in an ion trap. *Int J Mass Spectrom* 2000, 194(2-3): 145-164.
133. Nourse BD, Graham Cooks R: Proton affinity determinations using the kinetic method in an ion trap mass spectrometer. *Int J Mass Spectrom Ion Process* 1991, 106: 249-272.
134. Kuprin S, Graslund A, Ehrenberg A, Koch MH: Nonideality of water-hexafluoropropanol mixtures as studied by X-ray small angle scattering. *Biochem Biophys Res Commun* 1995, 217(3): 1151-1156.
135. Kaltashov IA, Fenselau C: Stability of secondary structural elements in a solvent-free environment: the alpha helix. *Proteins* 1997, 27(2): 165-170.
136. Ruotolo BT, McLean JA, Gillig KJ, Russell DH: The influence and utility of varying field strength for the separation of tryptic peptides by ion mobility-mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2005, 16(2): 158-165.
137. Ruotolo BT, Verbeck GF, Thomson LM, Gillig KJ, Russell DH: Observation of conserved solution-phase secondary structure in gas-phase tryptic peptides. *J Am Chem Soc* 2002, 124(16): 4214-4215.
138. Lampe J: Miniaturised non-aqueous SEC and MS-analysis of non-covalent complexes in non-aqueous solvents. *Praktikum*. Freising: Technische Universität München; 2005.

139. Hunter CL, Mauk AG, Douglas DJ: Dissociation of heme from myoglobin and cytochrome b5: comparison of behavior in solution and the gas phase. *Biochemistry* 1997, 36(5): 1018-1025.
140. Henion J, Li YT, Hsieh YL, Ganem B: Mass spectrometric investigations of drug-receptor interactions. *Ther Drug Monit* 1993, 15(6): 563-569.
141. Hargrove MS, Barrick D, Olson JS: The association rate constant for heme binding to globin is independent of protein structure. *Biochemistry* 1996, 35(35): 11293-11299.
142. Hargrove MS, Whitaker T, Olson JS, Vali RJ, Mathews AJ: Quaternary structure regulates heme dissociation from human hemoglobin. *J Biol Chem* 1997, 272(28): 17385-17389.
143. Mouis L, Aubagnac JL, Martinez J, Enjalbal C: Low energy peptide fragmentations in an ESI-Q-ToF type mass spectrometer. *J Proteome Res* 2007, 6(4): 1378-1391.
144. Maurus R, Overall CM, Bogumil R, Luo Y, Mauk AG, Smith M, Brayer GD: A myoglobin variant with a polar substitution in a conserved hydrophobic cluster in the heme binding pocket. *Biochim Biophys Acta* 1997, 1341(1): 1-13.
145. Silva MM, Rogers PH, Arnone A: A third quaternary structure of human hemoglobin A at 1.7-Å resolution. *J Biol Chem* 1992, 267(24): 17248-17256.
146. Bushnell GW, Louie GV, Brayer GD: High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome c. *J Mol Biol* 1990, 214(2): 585-595.
147. Mark KJ, Douglas DJ: Coulomb effects in binding of heme in gas-phase ions of myoglobin. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006, 20(2): 111-117.
148. Evans SV, Brayer GD: Horse heart metmyoglobin. A 2.8-Å resolution three-dimensional structure determination. *J Biol Chem* 1988, 263(9): 4263-4268.

---

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Mögliche Sekundärstrukturelemente einer Polypeptidkette.	3
Abb. 2: Schematische Darstellung möglicher Interaktionsmotive.	6
Abb. 3: Strukturmodell der dimeren Transmembrandomäne des Glykophorin A.	7
Abb. 4: Schematischer Aufbau der Sekundär- und Quartärstruktur von Peptidnukleinsäuren.	8
Abb. 5: Nukleobasen mit möglichen Basenpaarungen.	9
Abb. 6: Das Hexasaccharid des Chitins GlcNAc <sub>6</sub> bindet über Wasserstoffbrückenbindungen im aktiven Zentrum an Lysozym.	12
Abb. 7: Aufbau einer Elektrosprayquelle mit Z-förmigem Ioneneinlass.	14
Abb. 8: Aufbau eines Quadrupol-Flugzeit-Massenanalysators.	16
Abb. 9: Schematische Darstellung für den Verlauf einer kollisions-induzierten Dissoziation (CID).	17
Abb. 10: Fern-UV-Einzelspektren der Sekundärstrukturanteile.	25
Abb. 11: Gradientensystem zur automatisierten Durchführung von Konzentrationsmessungen.	29
Abb. 12: Komplexbildung der Untereinheiten der Tryptophan-Synthase aus heterolog exprimierten Proteinen, charakterisiert mittels Größenausschluss-Chromatographie.	32
Abb. 13: Identifizierung der <i>ZmTSA</i> -Untereinheit im Tryptophan-Synthase-Komplex, extrahiert aus Maisblättern.	33
Abb. 14: MS-Spektren einer [Lys(GlcNAc <sub>3</sub> )]-Lösung bei verschiedenen Kapillarspannungen.	35
Abb. 15: Chromatogramme der einzelnen Komplexsignale (EICs), die zur Optimierung der Kapillarspannung herangezogen wurden.	36
Abb. 16: Chromatogramme der einzelnen Komplexsignale (EICs), die zur Optimierung der Cone-Spannung herangezogen wurden.	36
Abb. 17: Chromatogramme der einzelnen Komplexsignale (EICs), die zur Optimierung der RF-Lens herangezogen wurden.	37
Abb. 18: MS-Spektren einer VSV wt-Lösung ohne bzw. mit Verwendung der MS-Profile Einstellung.	38
Abb. 19: Veränderung der Signalintensitäten bei Verwendung einer MS-Profile Einstellung im Vergleich zu den Signalintensitäten ohne MS-Profile.	38
Abb. 20: Modell eines VSV-wt-Dimers.	40
Abb. 21: Einfluss der Peptidkonzentration auf die Monomer-Oligomer-Anteile.	41
Abb. 22: Helikalität der VSV-Peptide in Abhängigkeit des Trifluorethanol-Gehalts.	42
Abb. 23: Dimeranteile der VSV-Mutanten in Abhängigkeit der TFE-Konzentration.	43
Abb. 24: Linearer Zusammenhang zwischen dem Helix- und dem Dimeranteil der VSV-Peptide.	44
Abb. 25: Linearer Zusammenhang zwischen dem Dimeranteil und der Dielektrizitätskonstante des Mediums.	46
Abb. 26: Oligomerisierung der VSV-Varianten im Vergleich zur Oligomerisierung von GpA als Positiv- und A16 als Negativkontrolle.	47
Abb. 27: MS-Spektrum einer in POPC Liposomen rekonstituierten Glykophorin A-Lösung.	49



---

Abb. 28: Oligomer m/z-Bereiche einer in POPC Lipiden rekonstituierten Glykophorin A Lösung.	50
Abb. 29: Sekundärstruktur einer 5 $\mu$ M ACTA-Probe in 5 mM Ammoniumacetat pH 7,0.	52
Abb. 30: Mögliche Strang-Orientierungen bei einer Hetero-Oligomerisierung von <u>ATCA</u> und TAGT.	53
Abb. 31: Mögliche Kombinationen für die Ausbildung von Hetero-Dimeren unter Berücksichtigung einer parallelen oder antiparallelen Orientierung der beiden Helixstränge.	54
Abb. 32: MS-Spektren einer 1:1-Mischung von a) <u>ATCA</u> und TAGT und b) ACTA und <u>TGAT</u> .	55
Abb. 33: MS-Spektren einer 1:1-Mischung von a) ACTA und TAGT und b) <u>ATCA</u> und <u>TGAT</u> .	55
Abb. 34: Quantitative Auswertung des Oligomeranteils bei paralleler und antiparalleler Paarung.	56
Abb. 35: Homo-Dimeranteile der PNA Mutanten.	57
Abb. 36: Homo- und Hetero-Dimeranteile einer 1:1-Mischung von ACGT und einer weiteren Peptidnukleinsäure.	58
Abb. 37: MS-Spektren einer Cytochrom b' <sub>559</sub> -Lösung in einer 80%igen TFE-Lösung mit 2 mM Ammoniumacetat pH 7,4.	60
Abb. 38: Detaildarstellung der Cytochrom b' <sub>559</sub> -Hämatin-Komplexbereiche.	61
Abb. 39: MS-Spektren der Cytochrom b' <sub>559</sub> -Mutanten nach der Zugabe von Hämatin.	62
Abb. 40: MS-Spektren einer 5 $\mu$ M Lysozymbilösung, welche mit 10 $\mu$ M Ligand versetzt wurde.	64
Abb. 41: MS-Spektrum einer 5 $\mu$ M Lysozymbilösung, versetzt mit 10 $\mu$ M GlcNAc.	64
Abb. 42: Chromatogramme (EICs) der Liganden (GlcNAc <sub>n</sub> mit n = 1-3), die den Verlauf der konzentrationsabhängigen Gradientenmessung wiedergeben.	66
Abb. 43: Chromatogramme (EICs) verschiedener Signale aus einer GlcNAc-Gradientenmessung mit 5 $\mu$ M Lysozym.	66
Abb. 44: Chromatogramme (EICs) verschiedener Signale aus einer GlcNAc <sub>2</sub> -Gradientenmessung mit 5 $\mu$ M Lysozym.	67
Abb. 45: Chromatogramme (EICs) verschiedener Signale aus einer GlcNAc <sub>3</sub> -Gradientenmessung mit 5 $\mu$ M Lysozym.	68
Abb. 46: Chromatogramme der detektierbaren Komplexe aus Lysozym und GlcNAc <sub>3</sub> , normiert auf 100% ihrer Maximalintensität.	69
Abb. 47: Chromatogramme (EICs) der 1:1- und 1:4-[Lys(GlcNAc <sub>3</sub> )]-Komplexe sowie des entstehenden GlcNAc <sub>3</sub> -Trimers im Zuge der Ligandkonzentrationsstudie, normiert auf 100% ihrer Maximalintensität.	69
Abb. 48: Scatchard-Plots zur Bestimmung der Dissoziationskonstante für a) GlcNAc <sub>2</sub> und b) GlcNAc <sub>3</sub> .	71
Abb. 49: MS-Spektren einer kompetitiven Inhibierung des [Lys(GlcNAc <sub>6</sub> )]-Komplexes mit unterschiedlichen GlcNAc <sub>3</sub> -Konzentrationen.	72
Abb. 50: MS-Spektren, die mit Hilfe der Signalintensitäten eine Unterscheidung zwischen spezifischer und unspezifischer Komplexbildung erlaubten.	74
Abb. 51: MS-Spektren einer Myoglobin und Cytochrom C-Lösung bei pH 7,0 und pH 3,3.	76
Abb. 52: Sekundärstrukturanteile einer Myoglobin und Cytochrom C-Lösung bei pH 7,0 und pH 3,3.	77
Abb. 53: MS-Spektren einer Myoglobinprobe in unterschiedlichen TFE-Konzentrationen.	79

---

Abb. 54: MS-Spektren einer Cytochrom C-Probe in unterschiedlichen TFE-Konzentrationen.	80
Abb. 55: MS-Spektren einer Myoglobinprobe unter dem Einfluss eines Denaturierungsreagenzes.	81
Abb. 56: Sekundärstrukturanteile einer 20 $\mu$ M Myoglobinlösung unter verschiedenen, denaturierenden Bedingungen.	82
Abb. 57: CID-Profile der 3-fach geladenen VSV-Homo-Dimere. Die ermittelten E50%-Werte liegen alle im gleichen Stabilitätsfenster.	83
Abb. 58: CID-Profile der 3-fach geladenen Homo-Dimere der Peptidnukleinsäuren.	84
Abb. 59: CID-Profile der 3-fach geladenen ACGT-Hetero-Dimere.	84
Abb. 60: CID-Profile der 3-fach geladenen Cytochrom b' <sub>559</sub> -Häm-Komplexe.	85
Abb. 61: CID-Profile der Lysozym- und Cytochrom C-Komplexe mit verschiedenen Liganden.	87
Abb. 62: CID-Profile von 9-fach geladenem Ferri-(III)- und Ferro-(II)-Myoglobin.	89
Abb. 63: CID-Kurven von Cytochrom C-Komplexen unterschiedlicher Ladungszustände.	90
Abb. 64: CID-Kurven verschiedener 8-fach geladener, kovalenter Komplexe.	91
Abb. 65: Schematische Darstellung von zwei kollidierenden Teilchen zur Definition des Stoßquerschnitts.	92
Abb. 66: CID-Profil eines 9-fach geladenen holo- $\alpha$ -Hämoglobins.	99
Abb. 67: Produktspektren der Dissoziation von Ferri-(III)-Myoglobin im Vergleich zu Ferro-(II)-Myoglobin bei unterschiedlichen Kollisionsenergien.	101
Abb. 68: Produktspektren verschiedener PNA-Hetero-Dimere bei einer Kollisionsspannung von 41 eV.	102
Abb. 69: Schematische Darstellung des VSV wt- und des VSV V2T,F14L-Homo-Dimers.	106
Abb. 70: Schematische Darstellung eines TGAT-Homo-Dimers und eines TAGT-Homo-Dimers.	109
Abb. 71: Mögliche Kombinationen bei der Zusammenlagerung zweier PNA-Helices.	110
Abb. 72: Dissoziationsprofile von PNA-Hetero-Dimeren unterschiedlicher Stabilität.	114
Abb. 73: Ionisierung der Proteine in einer ESI-Quelle.	120
Abb. 74: Schematische Darstellung der Ladungsverteilung nach der Dissoziation eines 3-fach geladenen Hetero-Dimers.	124
Abb. 75: Oligomerisierung von Gramicidin in der Gas-Phase bei unterschiedlichen Dielektrizitätskonstanten.	127
Abb. 76: Schematische Darstellung der verwendeten Komplexsysteme sowie der untersuchten Komplexeigenschaften.	135

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Extinktionskoeffizienten der Nukleosidmonophosphate.	24
Tabelle 2: Übereinstimmende MS-Signale der aus Mais-Blattextrakten isolierten <i>ZmTSA</i> -Sequenz und der Sequenz des heterolog exprimierten <i>ZmTSA</i> -Proteins.	33
Tabelle 3: Aminosäuresequenzen der verwendeten VSV-Peptide.	39
Tabelle 4: Koeffizienten der Korrelation zwischen Dimeranteil und der Helikalität.	45
Tabelle 5: Koeffizienten der Korrelation zwischen Dimeranteil und Dielektrizitätskonstante.	46
Tabelle 6: Verwendete Peptidnukleinsäuren.	51
Tabelle 7: Aminosäuresequenzen der verwendeten Cytochrom $b'_{559}$ -PsbF-Peptide.	59
Tabelle 8: E50%-Werte von [holo-Mb] <sup>9+</sup> aus Proben mit unterschiedlichem TFE-Gehalt.	89
Tabelle 9: Berechnete Werte für den Stoßquerschnitt der Protein-Komplexe.	94
Tabelle 10: Berechnete Energiewerte für kovalente Bindungsbrüche unter Einbeziehung multipler Stöße.	96
Tabelle 11: Berechnete Energiewerte für kovalente Bindungsbrüche unter Einbeziehung eines effektiven Stoßes.	97
Tabelle 12: Berechnete Energiewerte für nichtkovalente Komplexe unter Einbeziehung multipler Stöße.	97
Tabelle 13: Berechnete Energiewerte für nichtkovalente Komplexe unter Berücksichtigung eines effektiven Stoßes.	98
Tabelle 14: Mögliche Einordnung der Gas-Phasen-Basizitäten der Peptidnukleinsäuren anhand ihrer Fragmentierungsmuster.	103
Tabelle 15: E50%-Werte der PNA-Homo-Dimere.	113
Tabelle 16: Ermittelte Dissoziationskonstanten für die spezifischen Lysozym-Komplexe mit den Liganden GlcNAc <sub>2</sub> und GlcNAc <sub>3</sub> im Vergleich zu Literaturdaten.	118
Tabelle 17: Gramacidin-Dimeranteile in verschiedenen Lösemitteln.	128
Tabelle 18: Gas- und Flüssig-Phasen-Stabilitätswerte für nichtkovalente Komplexe.	130
Tabelle 19: Normierte Multi-Stoß-Dissoziationsenergien aus CID-Messungen nichtkovalenter Komplexe im Vergleich zu Bindungsenergien der Flüssig-Phase.	133
Tabelle 20: Normierte Ein-Stoß-Dissoziationsenergien aus CID-Messungen nichtkovalenter Komplexe im Vergleich zu Bindungsenergien der Flüssig-Phase.	134

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACHC	(1R,2R)-2-Aminocyclohexancarbonsäure
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
APP	Amyloid Precursor Protein
A $\beta$	$\beta$ -Amyloid
BIRD	Black Body Infrared Radiative Dissociation
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	circa
CATH	Classification by Class, Architecture, Topology and Homology
C <sub>D</sub>	Widerstandsbeiwert
CD	Zirkular Dichroismus
CID	Kollisions-induzierte Dissoziation
com	Schwerpunktsystem (center-of-mass)
Csl	Cäsiumiodid
Cyt	Cytochrom
DMPC	Dipalmitoyl-phosphatidylcholine
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPE	Dioleoyl-phosphatidylethanolamin
DOPS	Dioleoyl-phosphatidylserin
DTT	Dithiothreitol
E	Energie
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EI	Electron Impact
EIC	Extracted Ion Chromatogram
E <sub>kin</sub>	Kinetische Energie
ESI	Elektrospray-Ionisierung
Fe	Eisen
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FTICR	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance
GlcN	Glucosamin
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GpA	Glykophorin A
G-Protein	Glyko-Protein
H	Wasserstoff
Häm	Hämgruppe / Hämatin
Hb	Hämoglobin
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
I	Intensität
ID	Innendurchmesser
IRMPD	Infrarot Multiphotonen Dissoziation
IS	Interner Standard
K <sub>A</sub>	Affinitätskonstante
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
L	Ligand / Lipid
l	Wegstrecke
lab	Laborsystem
LC	Liquidchromatographie

---

Lys	Lysozym
m	Masse
m/z	Masse zu Ladung
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
Mb	Myoglobin
MCP	Major Coat Protein / Mikrokanalplatten
m <sub>g</sub>	Gasmasse
MIKE	Mass Analysed Ion Kinetic Energy
MNAc	N-Acetylmuraminsäure
m <sub>p</sub>	Masse Precursor Ion
m-RNS	Messenger-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie / massenspektrometrisch
MSP	MS-Profile
n	Gasdichte
N	Stickstoff
N <sub>A</sub>	Avogadro Konstante (= 6,022 x 10 <sup>23</sup> mol <sup>-1</sup> )
Nal	Natirumiodid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NSAID	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug
O	Sauerstoff
OH	Hydroxylgruppe
p	Druck / Ganghöhe einer Helix
P	Peptid
P/L	Peptid-Lipid-Verhältnis
PDB	Protein Databank
PNA	Peptidnukleinsäure
POPC	Palmitoyl-oleyl-phosphatidylcholin
Prot	Protein
psig	pound-force per square inch gauge
Q	Quadrupol / Ladung
Q-TOF	Quadrupol-Time-of-Flight
R	Gaskonstante (= 8.314 J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
r	Radius / Abstand
Irl	Vertrauenswert
r <sub>1</sub>	Korrelationskoeffizient
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
r <sub>2</sub>	Pearsonkoeffizient
REDOR	Rotational Echo Double Resonance
RF	Radiofrequenz
R <sub>g</sub>	Radius Gas
RNA	Ribonukleinsäure
R <sub>p</sub>	Radius Precursor Ion
rpm	revolutions per minute
S	Schwefel
SCOP	Structural Classification of Proteins
SD	Standard Deviation
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
SEC	Size-Exclusion-Chromatographie
Sm	small
SUV	small unilamellar vesicles
T	Temperatur
t'	Stoßanzahl
TFE	Trifluorethanol

$T_m$	Schmelztemperatur
TMD	Transmembrandomäne
TMS	Transmembransegment
TOF	Time-of-Flight
TS	Tryptophan-Synthase
TSA	Tryptophan-Synthase- $\alpha$ -Untereinheit
TSB	Tryptophan-Synthase- $\beta$ -Untereinheit
UV	Ultraviolett
v	Geschwindigkeit
V	Volumen
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
wt	Wildtyp
z	Ladung
z. B.	zum Beispiel
$\Delta E_{int}$	innere Energie
$\Delta G$	Bindungsenergie
$\epsilon$	Dielektrizitätskonstante
$\mu$	reduzierte Masse
$\rho$	Dichte
$\sigma$	Stoßquerschnitt
$\Phi$	Transfereffizienz
$\Omega$	Kreuzungswinkel

### Einheitenvorsätze

k	kilo = $10^3$
c	zenti = $10^{-2}$
m	milli = $10^{-3}$
$\mu$	mikro = $10^{-6}$
n	nano = $10^{-9}$

### Einheiten

Å	Angström
°C	Grad Celsius
cal	Kalorien (= 4184 J)
Da	Dalton
eV	Elektronenvolt
$g/cm^3$	Gramm pro Kubikzentimeter
g/mol	Gramm pro Mol
h bzw. hr	Stunde
J	Joule (= 0,2388 cal)
K	Kelvin
L	Liter
m	Meter
min	Minute
mol	Stoffmenge
mol/L	Mol pro Liter
psig	pound-force per square inch gauge
s	Sekunde
V	Volt

**Nukleotide**

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

**Aminosäuren**

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

## Anhang

## A. Tabellen

Tabelle 1a: m/z-Signale der einzelnen VSV-Peptide			
Substanzen	MW [g/mol]	Ionisierte Substanz	m/z
A16	2109,3	[A16 + 2H] <sup>2+</sup>	1055,7
		[A16 + 3H] <sup>3+</sup>	704,1
		[A16 + 4H] <sup>4+</sup>	528,3
	4218,6	[(A16) <sub>2</sub> + 3H] <sup>3+</sup>	1407,2
	6327,9	[(A16) <sub>3</sub> + 4H] <sup>4+</sup>	1583,0
Glykophorin A	2458,5	[GpA + 2H] <sup>2+</sup>	1230,3
		[GpA + 3H] <sup>3+</sup>	820,5
		[GpA + 4H] <sup>4+</sup>	615,6
	4917,0	[(GpA) <sub>2</sub> + 3H] <sup>3+</sup>	1640,0
	7275,5	[(GpA) <sub>3</sub> + 4H] <sup>4+</sup>	1844,9
VSV wt	2678,7	[VSV wt + 2H] <sup>2+</sup>	1340,4
		[VSV wt + 3H] <sup>3+</sup>	893,9
		[VSV wt + 4H] <sup>4+</sup>	670,7
	5357,4	[(VSV wt) <sub>2</sub> + 3H] <sup>3+</sup>	1786,8
	8036,1	[(VSV wt) <sub>3</sub> + 4H] <sup>4+</sup>	2010,0
VSV A3	2520,6	[VSV A3 + 2H] <sup>2+</sup>	1261,3
		[VSV A3 + 3H] <sup>3+</sup>	841,2
		[VSV A3 + 4H] <sup>4+</sup>	631,2
	5041,2	[(VSV A3) <sub>2</sub> + 3H] <sup>3+</sup>	1681,4
	7561,8	[(VSV A3) <sub>3</sub> + 4H] <sup>4+</sup>	1891,5
VSV G6A	2692,7	[VSV G6A + 2H] <sup>2+</sup>	1347,4
		[VSV G6A + 3H] <sup>3+</sup>	898,6
		[VSV G6A + 4H] <sup>4+</sup>	674,2
	5385,4	[(VSV G6A) <sub>2</sub> + 3H] <sup>3+</sup>	1796,1
	8079,1	[(VSV G6A) <sub>3</sub> + 4H] <sup>4+</sup>	2020,5
VSV G10A	2692,7	[VSV G10A + 2H] <sup>2+</sup>	1347,4
		[VSV G10A + 3H] <sup>3+</sup>	898,6
		[VSV G10A + 4H] <sup>4+</sup>	674,2
	5385,4	[(VSV G10A) <sub>2</sub> + 3H] <sup>3+</sup>	1796,1
	8079,1	[(VSV G10A) <sub>3</sub> + 4H] <sup>4+</sup>	2020,5
VSV G6,10A	2706,8	[VSV G6,10A + 2H] <sup>2+</sup>	1354,4
		[VSV G6,10A + 3H] <sup>3+</sup>	903,3
		[VSV G6,10A + 4H] <sup>4+</sup>	677,7
	5413,6	[(VSV G6,10A) <sub>2</sub> + 3H] <sup>3+</sup>	1805,5
	8120,4	[(VSV G6,10A) <sub>3</sub> + 4H] <sup>4+</sup>	2031,1
VSV V2T,F14L	2646,7	[VSV V2T,F14L + 2H] <sup>2+</sup>	1324,4
		[VSV V2T,F14L + 3H] <sup>3+</sup>	883,2
		[VSV V2T,F14L + 4H] <sup>4+</sup>	662,7
	5293,4	[(VSV V2T,F14L) <sub>2</sub> + 3H] <sup>3+</sup>	1765,5
	7940,1	[(VSV V2T,F14L) <sub>3</sub> + 4H] <sup>4+</sup>	1986,0



**Tabelle 1a: m/z-Signale der einzelnen VSV-Peptide - Fortsetzung**

<i>Substanzen</i>	<i>MW [g/mol]</i>	<i>Ionisierte Substanz</i>	<i>m/z</i>
Glykophorin A + POPC	3218,1	[(GpA) (POPC) + 3H] <sup>3+</sup>	1073,7
	3977,7	[(GpA) (POPC) <sub>2</sub> + 3H] <sup>3+</sup>	1326,9
	4737,3	[(GpA) (POPC) <sub>3</sub> + 3H] <sup>3+</sup>	1580,1
POPC	759,6	[POPC] <sup>1+</sup>	760,6
	1519,2	[(POPC) <sub>2</sub> ] <sup>1+</sup>	1520,2
	3798,0	[(POPC) <sub>5</sub> ] <sup>2+</sup>	1900,0
	4557,6	[(POPC) <sub>6</sub> ] <sup>2+</sup>	2279,8

**Tabelle 1b: m/z-Signale der einzelnen Peptidnukleinsäuren**

<i>Substanzen</i>	<i>MW [g/mol]</i>	<i>Ionisierte Substanz</i>	<i>m/z</i>
ACGT	2016,5	[ACGT + 2H] <sup>2+</sup>	1009,3
		[ACGT + 3H] <sup>3+</sup>	673,2
		[ACGT + 4H] <sup>4+</sup>	505,1
	4033,0	[(ACGT) <sub>2</sub> + 3H] <sup>3+</sup>	1345,3
ACTA	1997,5	[ACTA + 2H] <sup>2+</sup>	999,8
		[ACTA + 3H] <sup>3+</sup>	666,8
		[ACTA + 4H] <sup>4+</sup>	500,4
	3995,0	[(ACTA) <sub>2</sub> + 3H] <sup>3+</sup>	1332,7
ATCA	1997,5	[ATCA + 2H] <sup>2+</sup>	999,8
		[ATCA + 3H] <sup>3+</sup>	666,8
		[ATCA + 4H] <sup>4+</sup>	500,4
	3995,0	[(ATCA) <sub>2</sub> + 3H] <sup>3+</sup>	1332,7
TAGT	2028,5	[TAGT + 2H] <sup>2+</sup>	1015,3
		[TAGT + 3H] <sup>3+</sup>	677,2
		[TAGT + 4H] <sup>4+</sup>	508,1
	4057,0	[(TAGT) <sub>2</sub> + 3H] <sup>3+</sup>	1353,8
TGAT	2028,5	[TGAT + 2H] <sup>2+</sup>	1015,3
		[TGAT + 3H] <sup>3+</sup>	677,2
		[TGAT + 4H] <sup>4+</sup>	508,1
	4057,0	[(TGAT) <sub>2</sub> + 3H] <sup>3+</sup>	1353,8
ACGT + ACTA	4014,0	[(ACGT)(ACTA) + 3H] <sup>3+</sup>	1339,0
ACGT + ATCA	4014,0	[(ACGT)(ATCA) + 3H] <sup>3+</sup>	1339,0
ACGT + TAGT	4045,0	[(ACGT)(TAGT) + 3H] <sup>3+</sup>	1349,3
ACGT + TGAT	4045,0	[(ACGT)(TGAT) + 3H] <sup>3+</sup>	1349,3
ACTA + TAGT	4026,0	[(ACTA)(TAGT) + 3H] <sup>3+</sup>	1343,0
ACTA + TGAT	4026,0	[(ACTA)(TGAT) + 3H] <sup>3+</sup>	1343,0
ATCA + TAGT	4026,0	[(ATCA)(TAGT) + 3H] <sup>3+</sup>	1343,0
ATCA + TGAT	4026,0	[(ATCA)(TGAT) + 3H] <sup>3+</sup>	1343,0

**Tabelle 1c: m/z-Signale der einzelnen Cytochrom b<sub>559</sub>-Peptide**

<i>Substanzen</i>	<i>MW [g/mol]</i>	<i>Ionisierte Substanz</i>	<i>m/z</i>
Cytochrom b <sub>559</sub> wt	4934,1	[Cyt b <sub>559</sub> [1] + 4H] <sup>4+</sup>	1234,5
		[Cyt b <sub>559</sub> [1] + 5H] <sup>5+</sup>	987,8
Cytochrom b <sub>559</sub> R18A	4849,2	[Cyt b <sub>559</sub> (R18A) + 4H] <sup>4+</sup>	1213,3
		[Cyt b <sub>559</sub> (R18A) + 5H] <sup>5+</sup>	970,8
Cytochrom b <sub>559</sub> wt + Häm	5550,1	[Cyt b <sub>559</sub> [1](Häm) + 3H] <sup>3+</sup>	1851,0
		[Cyt b <sub>559</sub> [1](Häm) + 4H] <sup>4+</sup>	1388,5
Cytochrom b <sub>559</sub> R18A + Häm	5465,2	[Cyt b <sub>559</sub> (R18A)(Häm) + 3H] <sup>3+</sup>	1822,7
		[Cyt b <sub>559</sub> (R18A)(Häm) + 4H] <sup>4+</sup>	1367,3

**Tabelle 1d: m/z-Signale der einzelnen Liganden und Lysozym**

<i>Substanzen</i>	<i>MW [g/mol]</i>	<i>Ionisierte Substanz</i>	<i>m/z</i>
GlcNAc	221,1	[(GlcNAc) + 1H] <sup>1+</sup>	222,1
		[(GlcNAc) <sub>2</sub> + 1H] <sup>1+</sup>	444,2
GlcNAc <sub>2</sub>	424	[(GlcNAc <sub>2</sub> ) + 1H] <sup>1+</sup>	425,2
		[(GlcNAc <sub>2</sub> ) + 1H] <sup>+</sup>	850,0
GlcNAc <sub>3</sub>	627	[(GlcNAc <sub>3</sub> ) + 1H] <sup>1+</sup>	628,0
		[(GlcNAc <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 1H] <sup>1+</sup>	1256,0
		[(GlcNAc <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> + 2H] <sup>2+</sup>	943,5
GlcNAc <sub>6</sub>	1236	[(GlcNAc <sub>6</sub> ) + 1H] <sup>1+</sup>	1237,0
GlcN <sub>3</sub>	501,2	[(GlcN <sub>3</sub> ) + 1H] <sup>1+</sup>	502,2
		[(GlcN <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 1H] <sup>1+</sup>	1004,4
Lysozym	14305,0	[Lys + 6H] <sup>6+</sup>	2385,2
		[Lys + 7H] <sup>7+</sup>	2044,6
		[Lys + 8H] <sup>8+</sup>	1789,1
		[Lys + 9H] <sup>9+</sup>	1590,4
Lysozym + GlcNAc	14526,1 14747,2 14968,3	[Lys (GlcNAc) + 8H] <sup>8+</sup>	1816,8
		[Lys (GlcNAc) <sub>2</sub> + 8H] <sup>8+</sup>	1844,4
		[Lys (GlcNAc) <sub>3</sub> + 8H] <sup>8+</sup>	1872,0
Lysozym + GlcNAc <sub>2</sub>	14729,0 15153,0 15577,0 16001,0	[Lys (GlcNAc <sub>2</sub> ) + 8H] <sup>8+</sup>	1842,1
		[Lys (GlcNAc <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> + 8H] <sup>8+</sup>	1895,1
		[Lys (GlcNAc <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> + 8H] <sup>8+</sup>	1948,1
		[Lys (GlcNAc <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> + 8H] <sup>8+</sup>	2001,1
Lysozym + GlcNAc <sub>3</sub>	14932,0 15559,0 16186,0 16813,0 17440,0 18067,0	[Lys (GlcNAc <sub>3</sub> ) + 8H] <sup>8+</sup>	1867,5
		[Lys (GlcNAc <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 8H] <sup>8+</sup>	1945,9
		[Lys (GlcNAc <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> + 8H] <sup>8+</sup>	2024,3
		[Lys (GlcNAc <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> + 8H] <sup>8+</sup>	2102,6
		[Lys (GlcNAc <sub>3</sub> ) <sub>5</sub> + 8H] <sup>8+</sup>	2181,0
Lysozym + GlcNAc <sub>6</sub>	15541,0	[Lys (GlcNAc <sub>6</sub> ) + 8H] <sup>8+</sup>	2259,4
		[Lys (GlcNAc <sub>6</sub> ) + 8H] <sup>8+</sup>	1943,6
Lysozym + GlcNAc <sub>6</sub> + GlcNAc <sub>3</sub>	16168,0	[Lys (GlcNAc <sub>3</sub> )(GlcNAc <sub>6</sub> ) + 8H] <sup>8+</sup>	2020,8

**Tabelle 1d: m/z-Signale der Lysozym- und Cytochrom C-Komplexe**

<i>Substanzen</i>	<i>MW [g/mol]</i>	<i>Ionisierte Substanz</i>	<i>m/z</i>
Lysozym + GlcN <sub>3</sub>	14806,2	[Lys (GlcN <sub>3</sub> ) + 8H] <sup>8+</sup>	1852,5
	15307,4	[Lys (GlcN <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 8H] <sup>8+</sup>	1914,4
Cytochrom C	12359,0	[Cyt C + 6H] <sup>6+</sup>	2060,8
		[Cyt C + 7H] <sup>7+</sup>	1766,6
Cytochrom C + GlcNAc <sub>3</sub>	12986,0	[Cyt C (GlcNAc <sub>3</sub> ) + 7H] <sup>7+</sup>	1856,1
	13613,0	[Cyt C (GlcNAc <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 7H] <sup>7+</sup>	1945,7
	14240,0	[Cyt C (GlcNAc <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> + 7H] <sup>7+</sup>	2035,3
Cytochrom C + GlcN <sub>3</sub>	12860,2	[Cyt C (GlcN <sub>3</sub> ) + 6H] <sup>6+</sup>	2144,4
		[Cyt C (GlcN <sub>3</sub> ) + 7H] <sup>7+</sup>	1838,2
	13361,4	[Cyt C (GlcN <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 6H] <sup>6+</sup>	2227,9
		[Cyt C (GlcN <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 7H] <sup>7+</sup>	1909,8

**Tabelle 1e: m/z-Signale der einzelnen Häm-Proteine**

<i>Substanzen</i>	<i>MW [g/mol]</i>	<i>Ionisierte Substanz</i>	<i>m/z</i>
holo-Myoglobin	17'567,4	[holo-Mb + 8H] <sup>8+</sup>	2196,9
		[holo-Mb + 9H] <sup>9+</sup>	1952,9
		[holo-Mb + 10H] <sup>10+</sup>	1757,7
		[holo-Mb + 11H] <sup>11+</sup>	1598,0
		[holo-Mb + 12H] <sup>12+</sup>	1465,0
		[holo-Mb + 13H] <sup>13+</sup>	1352,3
		[holo-Mb + 14H] <sup>14+</sup>	1255,8
		[holo-Mb + 15H] <sup>15+</sup>	1172,2
		[holo-Mb + 16H] <sup>16+</sup>	1099,0
		apo-Myoglobin	16'951,4
[apo-Mb + 8H] <sup>8+</sup>	2119,9		
[apo-Mb + 9H] <sup>9+</sup>	1884,5		
[apo-Mb + 10H] <sup>10+</sup>	1696,1		
[apo-Mb + 11H] <sup>11+</sup>	1542,0		
[apo-Mb + 12H] <sup>12+</sup>	1413,6		
[apo-Mb + 13H] <sup>13+</sup>	1305,0		
[apo-Mb + 14H] <sup>14+</sup>	1211,8		
[apo-Mb + 15H] <sup>15+</sup>	1131,1		
[apo-Mb + 16H] <sup>16+</sup>	1060,5		
[apo-Mb + 17H] <sup>17+</sup>	998,1		
[apo-Mb + 18H] <sup>18+</sup>	942,7		
[apo-Mb + 19H] <sup>19+</sup>	893,2		
[apo-Mb + 20H] <sup>20+</sup>	848,6		
[apo-Mb + 21H] <sup>21+</sup>	808,2		
[apo-Mb + 22H] <sup>22+</sup>	771,5		
[apo-Mb + 23H] <sup>23+</sup>	738,0		
apo-α-Hämoglobin	15'125,0	[apo-α-Hb + 8H] <sup>8+</sup>	1891,6
holo-α-Hämoglobin	15'741,0	[holo-α-Hb + 9H] <sup>9+</sup>	1750,0
apo-β-Hämoglobin	15'867,0	[apo-β-Hb + 8H] <sup>8+</sup>	1984,4
holo-β-Hämoglobin	16'483,0	[holo-β-Hb + 9H] <sup>9+</sup>	1832,4

**Tabelle 1e: m/z-Signale der einzelnen Häm-Proteine – Fortsetzung**

<i>Substanzen</i>	<i>MW [g/mol]</i>	<i>Ionisierte Substanz</i>	<i>m/z</i>	
Cytochrom C	12'359,0	[Cyt C + 5H] <sup>5+</sup>	2472,8	
		[Cyt C + 6H] <sup>6+</sup>	2060,8	
		[Cyt C + 7H] <sup>7+</sup>	1766,6	
		[Cyt C + 8H] <sup>8+</sup>	1545,9	
		[Cyt C + 9H] <sup>9+</sup>	1374,2	
		[Cyt C + 10H] <sup>10+</sup>	1236,9	
		[Cyt C + 11H] <sup>11+</sup>	1124,5	
		[Cyt C + 12H] <sup>12+</sup>	1030,9	
		[Cyt C + 13H] <sup>13+</sup>	951,7	
		[Cyt C + 14H] <sup>14+</sup>	883,8	
		[Cyt C + 15H] <sup>15+</sup>	824,9	
		[Cyt C + 16H] <sup>16+</sup>	773,4	
		24718,0	[(Cyt C) <sub>2</sub> + 11H] <sup>11+</sup>	2248,1
			[(Cyt C) <sub>2</sub> + 13H] <sup>13+</sup>	1902,4

**Tabelle 1f: m/z-Signale sonstiger Moleküle**

<i>Substanzen</i>	<i>MW [g/mol]</i>	<i>Ionisierte Substanz</i>	<i>m/z</i>
Häm	616,4	[Häm + 1H] <sup>1+</sup>	617,5
Malantide (IS)	1633,9	[IS + 2H] <sup>2+</sup>	818,0
		[IS + 3H] <sup>3+</sup>	545,6

**Tabelle 2a: Optimierte Methode zur Charakterisierung der VSV-Peptide und Cyt b'559**

<i>Spannungen [V]</i>		<i>Weitere</i>	
Kapillare	3200	Kollisionsenergie [eV]	10
Cone	140	Pusher time [µsec]	88
RF-Lens	80	Transport	4
		Aperture	6
<u>MS-Profil:</u> mass ramp time dwell time			
	600	2	2
	1800	75	21
	2100		

**Tabelle 2b: Optimierte Methode zur Charakterisierung der Peptidnukleinsäuren**

<i>Spannungen [V]</i>		<i>Weitere</i>	
Kapillare	2700	Kollisionsenergie [eV]	10
Cone	60	Pusher time [µsec]	108
RF-Lens	60	Transport	4
		Aperture	6
<u>MS-Profil:</u> keines			

**Tabelle 2c: Optimierte Methode zur Charakterisierung der Hämproteine**

<i>Spannungen [V]</i>		<i>Weitere</i>	
Kapillare	2500	Kollisionsenergie [eV]	10
Cone	40	Pusher time [µsec]	88
RF-Lens	80	Transport	4
		Aperture	12
<u>MS-Profil:</u> keines			

**Tabelle 2d: Optimierte Methode zur Charakterisierung der Lysozym-Komplexe**

<i>Spannungen [V]</i>		<i>Weitere</i>	
Kapillare	2500	Kollisionsenergie [eV]	10
Cone	100	Pusher time [µsec]	108
RF-Lens	80	Transport	4
		Aperture	6
<u>MS-Profil:</u> keines			

**Tabelle 3a: E50%-Werte unterschiedlich geladener Cytochrom C-Komplexe**

Ladung (z)	E50%	E50% * z
5	75	375
6	60	360
7	53	371
8	48	384
9	39	351
Mittelwert:		368 ± 13

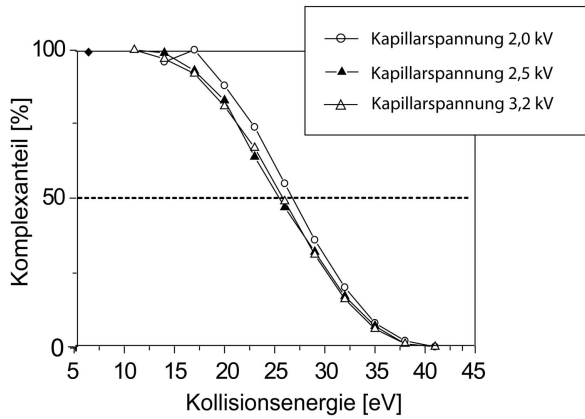
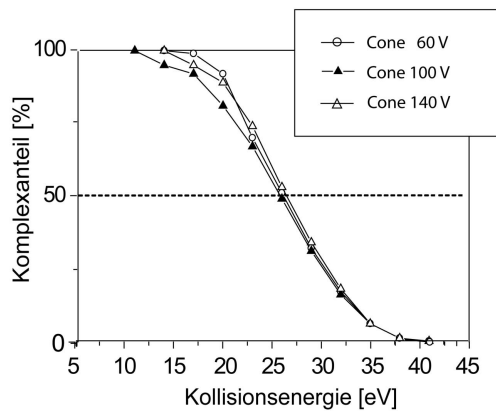
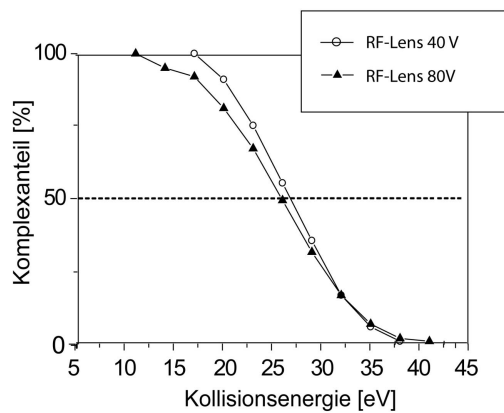
**Tabelle 3b: E50%-Werte unterschiedlich geladener apo-Myoglobin-Komplexe**

Ladung (z)	E50%	E50% * z
8	60	480
9	55	495
10	46	460
11	42	462
12	38	456
Mittelwert:		471 ± 16

**Tabelle 4: Berechnete Stoßanzahl**

<i>Kovalente Moleküle</i>		<i>Nichtkovalente Komplexe</i>	
Cytochrom C	61	Myoglobin	84
apo-Myoglobin	83	α-Hämoglobin	66
apo-α-Hämoglobin	65	β-Hämoglobin	67
apo-β-Hämoglobin	66	Glykophorin A	33
Lysozym	68	ACGT-Dimer	22
		Cyt b' <sub>559</sub> -Dimer	38

## B. Abbildungen

Abb. 1: CID-Profile des  $[\text{Lys}(\text{GlcNAc}_3)]^{8+}$ -Komplexes bei verschiedenen Kapillarspannungen.Abb. 2: CID-Profile des  $[\text{Lys}(\text{GlcNAc}_3)]^{8+}$ -Komplexes bei verschiedenen Cone-Spannungen.Abb. 3: CID-Profile des  $[\text{Lys}(\text{GlcNAc}_3)]^{8+}$ -Komplexes bei verschiedenen RF-Lens Einstellungen.

### C. Berechnungen und Herleitungen

#### 1. Herleitung von Formel (4) durch Umformen der Formel (3)

I) Formel (3):  $\sigma = \pi(R_p + R_g)^2$

II)  $R_p$  kann unter der Annahme, dass die untersuchten Komplexe eine kugelförmige Struktur aufweisen, wie folgt ersetzt werden:

$$\text{Kugelvolumen: } V = \frac{4}{3}\pi R_p^3 \quad \Rightarrow \quad R_p = \sqrt[3]{3V/4\pi}$$

III) Mit  $V = \frac{m_p}{\rho}$  erhält man:  $R_p = \sqrt[3]{3m_p/4\pi\rho}$

IV) Durch Einsetzen von  $R_p$  in Formel (3) erhält man Formel (4):

$$\sigma = \pi(\sqrt[3]{3m_p/4\pi\rho} + R_g)^2$$


---

#### 2. Berechnung des Widerstandsbeiwertes nach Chen et al. [115]

I) Kinetische Energie:  $E_{Kin} = \frac{1}{2}m_p v^2 \quad \Rightarrow \quad v = \sqrt{2E_{Kin}/m_p}$

II) Die Geschwindigkeit ( $v$ ) des Teilchens relativ zur thermalen Geschwindigkeit des Gases ist gegeben durch:

$$s = \frac{v}{\sqrt{2kT/m_g}}$$

wobei  $k$  = Boltzmann Konstante (=  $1,381 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ )

$T = 298 \text{ K}$

III) Findet ein inelastischer Stoß und dadurch bedingt eine diffuse Streuung statt berechnet sich der Widerstandsbeiwert ( $C_D$ ) für  $s > 1$  wie folgt:

$$C_D = 2 + \frac{2}{s^2} + \frac{1,058}{s} \sqrt{T_w/T} - \frac{1}{s^4}$$

mit  $T_w$  = Wandtemperatur und  $T$  = Gas-Temperatur. Sind diese identisch reduziert sich die Gleichung auf:

$$C_D = 2 + \frac{2}{s^2} + \frac{1,058}{s} - \frac{1}{s^4}$$


---



## Eigene Veröffentlichungen

**Teile dieser Arbeit wurden bisher publiziert bzw. sind eingereicht.**

### *Publikationen:*

Weigang LMM, Langosch D and Letzel T: Gas-phase behaviour of noncovalent transmembrane segment complexes. Rapid Commun Mass Spectrom 2008; 22 (24): 4089-97.

Kriechbaumer V, Weigang L, Fießelmann A, Letzel T, Frey M, Gierl A, Glawischnig E: Characterisation of the tryptophan synthase alpha subunit in maize. BMC Plant Biology 2008, 8, 44.

Diezemann N, Weigang LMM, Chakrabort P, Frauendorf H, Letzel T, and Diederichsen U: Organization of nucleobase-functionalized beta-peptides investigated by soft electrospray ionization mass spectrometry. J Mass Spectrom 2009 Jan 26. online verfügbar

Dennhart N, Weigang LMM, Fujiwara M, Fukamizo T, Skriver K, and Letzel T: Enzymatic characterization of the 26 kDa endochitinase from barley seeds by continuous flow – mass spectrometry. FEBS J 2008, eingereicht.

Weigang LMM and Letzel T: Collision-Induced Dissociation-Mass Spectrometry – A Multifunctional Tool for Studying Noncovalent Complexes and Contained Biopolymers, Eur J Mass Spectrom 2008, eingereicht.

### *Posterbeiträge:*

Letzel T., Weigang LMM, New observations in detecting noncovalent complexes by MS and CID-MS/MS, DGMS 2008, Giessen (D), 02.-05.03. 2008.

Weigang LMM, Letzel T, Gas-phase stability of protein and protein-complexes studied by collision-induced dissociation mass spectrometric measurements, Interact PhD Symposium 2007, Martinsried (D), 07.12.2007

Weigang LMM, Letzel T, Mass spectrometric gas phase results combined with liquid phase information for the observation of non-covalent transmembrane peptide complexes, Euroanalysis XIV, Antwerp (B), 09.-14.09. 2007.

Weigang LMM, Letzel T, Gasphasenverhalten hydrophober nichtkovalenter Komplexe mittels massenspektrometrischer Analyse, ANAKON 2007, Jena (D), 27.-30.03. 2007.

Mühlberger L, Weigang LMM, Letzel T, Kontinuierliche Flussstudien mit massenspektrometrischer Detektion zur Bestimmung nichtkovalenter Komplexe, ANAKON 2007, Jena (D), 27.-30.03. 2007.

Weigang LMM, Letzel T, Oligomerization of hydrophobic peptides: Mass spectrometric gas phase information combined with liquid phase information, DGMS 2007, Bremen (D), 11.-14.03. 2007.

Weigang LMM, Mühlberger L, Letzel T, Development of non-covalent complexes by continuous flow assays with mass spectrometric detection, DGMS 2007, Bremen (D), 11.-14.03. 2007.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Linda Maria Martha Weigang  
Geburtsdatum/-ort: 31.01.1979, Amberg  
Wohnsitz: Wirtstr. 42, 81539 München

### Schulbildung

1985 – 1990 Erasmus-Grasser-Volksschule, Schmidmühlen  
1990 – 1999 Johann-Michael-Fischer-Gymnasium, Burglengenfeld  
Allgemeine Hochschulreife, 25.06.1999

### Akademische Ausbildung

11/1999 – 02/2005 Studium der Chemie, Universität Regensburg  
Diplom, 31.01.2005  
*Diplomarbeit bei Prof. Dr. C. Steinem:*  
Isolierung, Rekonstitution und Charakterisierung des MDR3-Proteins und  
Entwicklung eines fluoreszenten online-assays zum Phosphatnachweis mit  
Europium-Tetracyclin

10/2003 – 07/2004 Zusatzstudium: Internationale Handlungskompetenz, Regensburg

10/2001 – 03/2002 Auslandssemester, Trinity College, Dublin

seit 03/2005 Promotion am Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere bei Prof. Dr. D. Langosch  
in der analytischen Forschungsgruppe von Dr. T. Letzel, TU München

### Sonstige Tätigkeiten:

08/2003 – 02/2004 Munich Biotech, München – Praktikum und Werkstudententätigkeit  
Bereich: Bioanalytik

09/2002 – 10/2002 Profos AG, Regensburg – Forschungspraktikum

**Sprachkenntnisse:** Englisch, Latein

**Hobbys:** fremde Länder und Kulturen, Aerobic, Golf