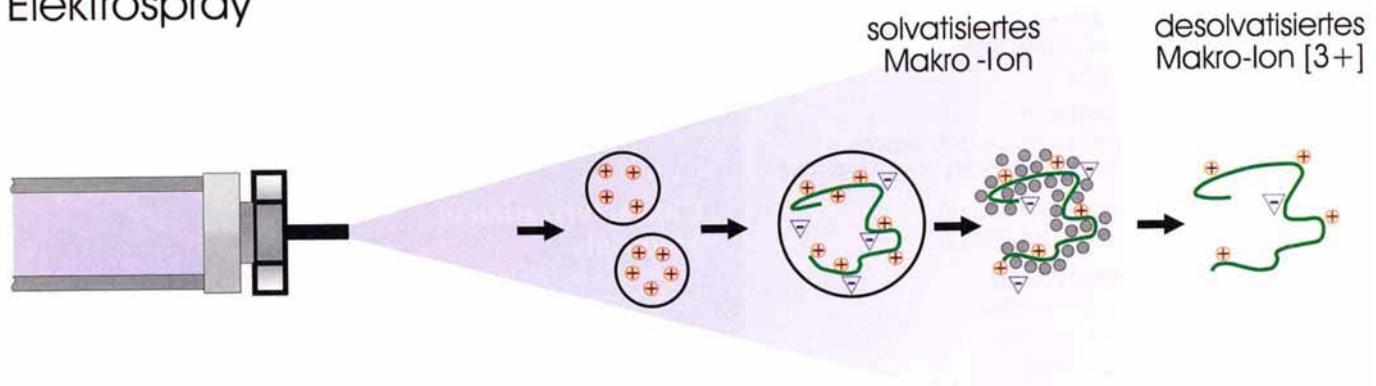
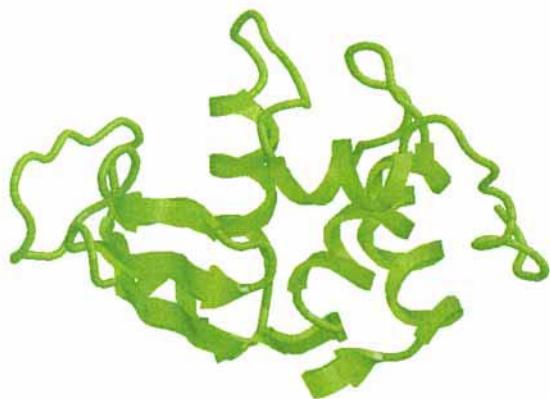


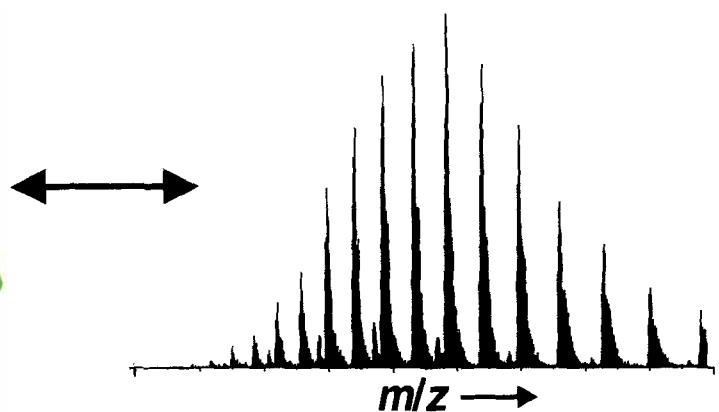
Elektrospray



Proteinstruktur



Ladungsstruktur



Schematische Darstellungen der Elektrospray-Ionisierung unter Bildung von desolvatisierten Makro-Ionen (oben) und der Beziehung zwischen Makromolekülstruktur und Ionen-Ladungsstruktur im Elektrospray-Massenspektrum (unten).

Elektrospray-Massenspektrometrie von Biomakromolekülkomplexen mit nichtkovalenten Wechselwirkungen – neue analytische Perspektiven für supramolekulare Chemie und molekulare Erkennungsprozesse

Michael Przybylski* und Michael O. Glocker

Die Entwicklung von schonenden Ionisierungsmethoden hat in den letzten Jahren zu bedeutenden Fortschritten in der massenspektrometrischen Charakterisierung von Makromolekülen, insbesondere von Biopolymeren wie Proteinen und Nucleinsäuren, geführt. Während bei anderen Methoden wie dem Beschuß mit schnellen Atomen (Fast Atom Bombardment, FAB) und der Plasmadesorption noch Molekulargewichtsbegrenzungen bestehen, gelang mit Hilfe der Elektrospray- (ESI-MS) und der matrixunterstützten Laserdesorptions/ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) ein Durchbruch zu Makromolekülen >100 kDa. Während ESI- und MALDI-MS bereits erfolgreich zur Molekulargewichts- und Primärstrukturbestimmung bei Biopolymeren eingesetzt wurden, eröffnet die – erst in jüngster Zeit entdeckte – direkte Charakterisierung von Komplexen mit nichtkovalenten Wechselwirkungen (nichtkovalente Komplexe) durch ESI-MS neue Perspektiven für die su-

pramolekulare Chemie und die analytische Biochemie. Im Gegensatz zu anderen massenspektrometrischen Methoden lässt sich die ESI-MS in homogener Lösung unter nahezu physiologischen pH-, Konzentrations- und Temperaturbedingungen durchführen. Die ESI-MS von Biopolymeren, insbesondere Proteinen, liefert Serien vielfach geladener Makromolekulationen mit für die Tertiärstruktur charakteristischen Ladungszahlen und -verteilungen („Ladungsstrukturen“), die eine Differenzierung von nativen und denaturierten Strukturen ermöglichen. Die Grundlagen der ESI-Methode und bisherige Kenntnisse zum Ionenbildungsmechanismus, Beziehungen zwischen Tertiärstrukturen in Lösung und Ladungsstrukturen von Makro-Ionen in der Gasphase sowie experimentelle Voraussetzungen für den Nachweis nichtkovalenter Komplexe werden im ersten Teil dieser Übersicht beschrieben. Erfolgreiche Anwendungen zur Identifizierung von Enzym-Substrat- und -Inhibitor-Komplexen, supra-

molekularen Protein- und Protein-Nucleotid-Komplexen, Doppelstrang-Polynucleotiden sowie synthetischen supramolekularen Komplexen zeigen ein großes Potential für die direkte Analyse spezifischer nichtkovalenter Wechselwirkungen. Die bisherigen Ergebnisse lassen Charakterisierungen von supramolekularen Strukturen und molekularen Erkennungsprozessen erwarten, die bisher mit massenspektrometrischen Methoden nicht möglich waren; hierzu zählen die sequenzspezifische Oligomerisierung von Polypeptiden, Antigen-Antikörper-Komplexe, Enzym- und Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen sowie die Erkennungsstrukturen bei kombinatorischen Synthesen und selbstorganisierten Systemen.

Stichworte: Makromoleküle · Massenspektrometrie · Nichtkovalente Wechselwirkungen · Selbstorganisation · Supramolekulare Chemie

1. Einleitung

Die Entwicklung von effizienten schonenden Ionisierungsmethoden hat in den letzten Jahren zu bedeutenden Fortschritten bei der direkten massenspektrometrischen Charakterisierung von Makromolekülen, insbesondere von Biopolymeren wie Proteinen und Nucleinsäuren, geführt^[1–3]. Molekülionen höhermolekularer Verbindungen wurden erstmals in den siebziger

Jahren mit der Felddesorptions-Massenspektrometrie (FD-MS) erhalten^[4]. Seit den achtziger Jahren gelangen empfindliche und exakte Molekulargewichtsbestimmungen an Polypeptiden und kleineren Proteinen durch Beschuß mit keV-Primärpartikeln (Fast-Atom-Bombardment(FAB)-MS oder LSIMS)^[5] und durch ²⁵²Cf-Plasmadesorptions-Massenspektrometrie (PD-MS)^[6, 7]. Ein Durchbruch der Makromolekül-Massenspektrometrie zu Molekulargewichten >100 kDa gelang mit der Entwicklung der Elektrospray- (ESI-MS)^[8] und der matrixunterstützten Laserdesorption/ionisation-Massenspektrometrie (MALDI-MS)^[9]. Mit diesen beiden Methoden konnte die bisherige Begrenzung der massenspektrometrischen Analyse von Polymeren generell überwunden werden^[10, 11].

[*] Prof. Dr. M. Przybylski, Dr. M. O. Glocker
Fakultät für Chemie der Universität
Postfach 55 60 M731, D-78434 Konstanz
Telefax: Int. +7531/88-3097
E-mail: Michael.Przybylski@uni-konstanz.de

Trotz der meist geringen – oder fehlenden – Fragmentierung von Makromolekülen^[12] haben die oben genannten Ionisierungsmethoden bereits breite Anwendung zur Analyse der Primärstruktur von Biopolymeren gefunden. Neben stoßinduzierter Fragmentierung und Tandem-MS-Analyse (z.B. durch FAB-MS^[13]) wurden hierzu Kombinationen mit spezifischen chemischen (z.B. enzymatischen) Abbauverfahren entwickelt und zur Analyse von Proteinsequenzen eingesetzt^[14]. So ermöglicht die massenspektrometrische Analyse von Peptidgemischen nach proteolytischem Abbau (peptide mapping)^[15] die Struktur/Funktions-Charakterisierung von Proteinen, z.B. die Identifizierung von post-translationalen Strukturmodifikationen mit kovalenten Bindungen^[16], die Bestimmung von Epitopequenzen in Antigen-Antikörper-Komplexen^[17] sowie die Charakterisierung von Isoenzymen^[18] und rekombinanten Proteinen^[19].

Im Gegensatz zur Primärstrukturanalyse war die Charakterisierung von Tertiärstrukturen und supramolekularen Komplexen^[20] von Makromolekülen mit massenspektrometrischen Methoden bis vor kurzem nicht möglich. Untersuchungen von Tertiärstrukturen wurden nur vereinzelt durchgeführt, z.B. die Analyse der strukturspezifischen Fragmentierung α -helicaler Polypeptide in FAB-Massenspektren^[21] und PD-Massenspektren von Proteinen, in denen eine starke Abhängigkeit der Molekülionenintensität von der Erhaltung intakter Tertiärstrukturen und eine Unterdrückung von Molekülionensignalen nach Denaturierung auf dem Nitrocellulose-Probenträger beobachtet wurden^[6b, 14, 22]. Die jüngste Entwicklung der Elektrospray-Massenspektrometrie hat diese Situation deutlich verändert. Eine Reihe supramolekularer Komplexe von Biopolymeren und Komplexe mit niedermolekularen Komponenten konnten in den

letzten drei Jahren durch ESI-MS identifiziert werden^[23, 24]. Während bei anderen Ionisierungsmethoden aus flüssiger (FAB-MS^[5]) oder fester Phase (PD-MS, MALDI-MS^[6, 11]) überwiegend einfach geladene Molekülionen entstehen, liefert die ESI-MS vielfach geladene Makro-Ionen aus homogener Lösung mit einer für die Lösungsstruktur charakteristischen Ladungsverteilung („Ladungsstruktur“, siehe Abschnitt 2)^[10, 24–26]. Die ESI-MS lässt sich zudem problemlos mit wäßrigen Lösungen unter nahezu physiologischen Bedingungen durchführen und ermöglicht so Vergleiche mit den Ergebnissen anderer Methoden der Strukturmöglichkeit wie der NMR-Spektroskopie^[27].

Die direkte massenspektrometrische Charakterisierung nichtkovaler Komplexe von Makromolekülen eröffnet neue Perspektiven für die supramolekulare Chemie, in der ein erheblicher Bedarf an empfindlichen und molekulspezifischen Analysenmethoden besteht^[28]. Im Gegensatz zu anderen Charakterisierungsmethoden ist die ESI-MS auf Verbindungen relativ geringer Reinheit und auf Gemische anwendbar und lässt sich mit Mikrotrennmethoden kombinieren^[10]. Der Mechanismus der Ionenbildung bei der ESI-Methode ist bisher nicht im Detail geklärt; jedoch konnten bereits Komplexe mit unterschiedlichen Wechselwirkungen (z.B. ionisch, hydrophob) erfolgreich charakterisiert werden. Wir diskutieren hier die bisherigen Ergebnisse vor allem im Hinblick auf Anwendungen in der Biochemie und der supramolekularen Chemie. Der derzeitige Entwicklungsstand der ESI-Methode bezüglich der Bildung von Makromolekülen und deren Korrelation mit Strukturen in Lösung sind im ersten Abschnitt zusammengefasst. In den weiteren Abschnitten wird die Charakterisierung nichtkovaler Komplexe

Michael Przybylski, geboren 1948 in Berlin, studierte Chemie an der Universität Mainz und promovierte 1975 bei H. Ringsdorf mit einer Arbeit über Synthese und Metabolismus polymerer Sulfonamide. Nach einem zweijährigen Forschungsaufenthalt am National Cancer Institute, NIH Bethesda, USA, mit biochemischen Arbeiten über Antifolat-Cytostatica kehrte er an die Universität Mainz zurück und habilitierte sich 1985 mit einer Arbeit über die Entwicklung und bioanalytische Anwendung massenspektrometrischer Methoden zur Strukturaufklärung von Naturstoffen und Chemothapeutica. 1987 folgte er einem Ruf als Professor für Analytische Chemie an die Universität Konstanz. Er hat Gastprofessuren an den Universitäten Odense, Budapest und Szeged wahrgenommen, den St.-Denis-Forschungspreis erhalten und ist Autor von etwa 160 Originalpublikationen. Zu seinen Forschungsgebieten zählen die Struktur und Wirkungsweise von Lipid-modifizierten Peptiden und Proteinen, Struktur und Abbau von Zelloberflächenproteinen, Xenobiotica-Peptid-Konjugate sowie die Massenspektrometrie von Biomakromolekülen; Schwerpunkte im letzten Bereich sind massenspektrometrische und proteinchemische Methoden zur Charakterisierung von Tertiärstrukturen, antigenen Determinanten und supramolekularen Komplexen.



M. Przybylski



M. O. Glocker

Michael O. Glocker, geboren 1960 in Altheim, Baden-Württemberg, studierte Chemie an der Universität Konstanz und promovierte 1990 bei J. C. Jochims mit einer Arbeit über Nitriliumsalze als reaktive Intermediate. Nach zwei Jahren an der Oregon State University, Corvallis, USA, bei M. L. Deinzer, bei dem er über Strukturuntersuchungen an Makrophagenkolonie-stimulierenden Proteinen sowie natürlichen und chemisch modifizierten Phytoalexin-Elicitoren arbeitete, kehrte er 1992 an die Universität Konstanz zurück. Er ist dort seitdem als wissenschaftlicher Mitarbeiter und Habilitand (seit 1994 als DFG-Habilitationssstipendiat) tätig. Er ist Autor von etwa 30 Originalpublikationen. Seine Forschungsschwerpunkte sind die Charakterisierung von Protein-Tertiärstrukturen und Disulfidbrücken-vermittelten Faltungsreaktionen mit proteinchemischen und massenspektrometrischen Methoden sowie die strukturelle Charakterisierung von natürlichen und rekombinanten Zytokinen.

von Biopolymeren und von synthetischen supramolekularen Komplexen vorgestellt. Daran schließt sich ein Ausblick auf den möglichen Einsatz anderer massenspektrometrischer Methoden an. Angesichts der noch jungen Entwicklung der ESI-Methode soll dieser Beitrag keine vollständige Übersicht sein, sondern zur Ermittlung des weiteren Anwendungspotentials in Verbindung mit etablierten Methoden der Charakterisierung von supramolekularen Strukturen anregen.

2. Elektrospray-Massenspektrometrie von Biopolymeren

2.1. Bildung von Makromolekülionen durch Elektrospray-Ionisierung

Erste Untersuchungen zur Ionisierung von Makromolekülen durch Elektrospray wurden bereits vor mehr als zwanzig Jahren von Dole et al. durchgeführt^[29]. Die analytische Nutzung der ESI-MS setzte jedoch erst 1988 mit der Entwicklung geeigneter Ionenquellen für Quadrupol-Massenspektrometer ein^[8, 10, 30]. Zwei in kommerziellen Quadrupolanalysatoren häufig verwendete Ionenquellen sind schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

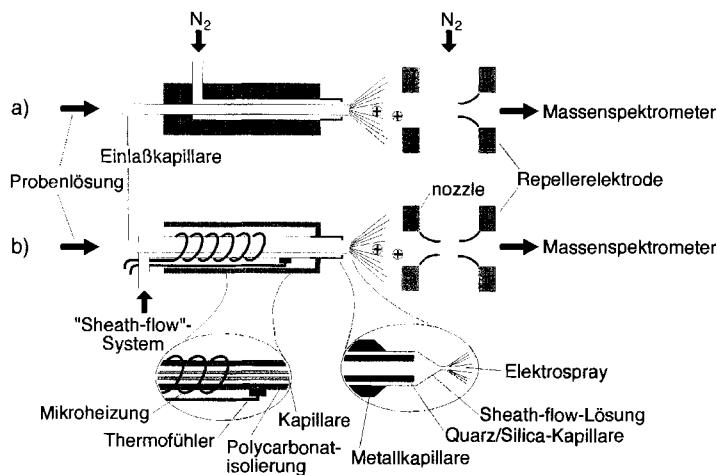


Abb. 1. Schematische Darstellung von Elektrospray-Ionenquellen kommerzieller Quadrupol-Massenspektrometer. a) Ionquelle mit Gegenstromgas (N_2) (Ionspray-Quelle, z.B. Sciex-API III [30]); b) thermisch unterstützte Elektrospray-Ionenquelle ohne Gegenstromgas (Vestec-A201-ESI-MS-Quelle) [33]. Teilvergrößerungen zeigen eine Liquid-sheath-flow-Konfiguration der Einlaßkapillare (unten rechts) [35] und eine thermostatisierbare Kapillarheizung (unten links), mit der Temperaturen von ca. 20–80 °C eingestellt werden können [37].

Die Probenlösung wird mit einer Fließgeschwindigkeit von ca. 2–10 $\mu\text{L min}^{-1}$ durch eine Mikrokapillare (meist aus polyimidbeschichtetem Quarzglas) gepumpt, deren Ende durch eine Metallkapillarspitze geführt ist. Ein elektrisches Feld mit einer Potentialdifferenz von ca. 2–5 kV zwischen dem Kapillarenden und einer zylindrischen Eintrittsblende („nozzle“) erzeugt den Spray geladener Aerosoltröpfchen in der Ionisierungskammer^[10]. Beim Ionisierungsprozeß, der ursprünglich als „Ionenverdampfung“^[31] bezeichnet wurde, werden Makromolekülionen (Kationen und Anionen) mit unterschiedlichen Ladungszahlen durch schnelle Zerstäubung der Tröpfchen („Nano-droplets“) und Desolvatisierung gebildet. Ein wesentlicher Para-

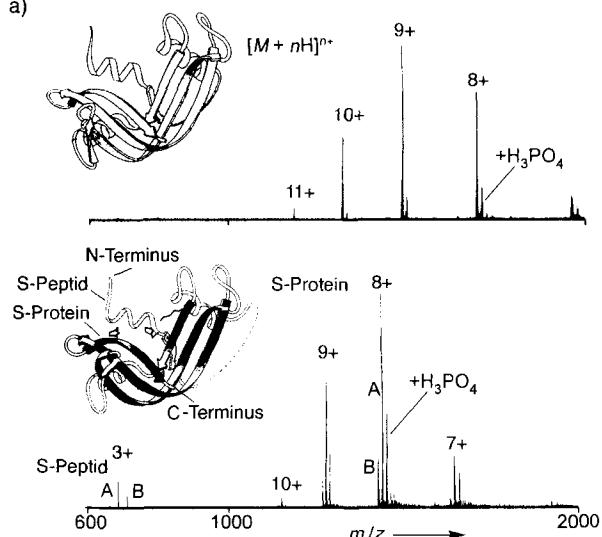
meter für die Desolvatisierung der Makro-Ionen ist dabei ein geringes Potential (ca. 10–100 V) zwischen der Eintrittsblende und einer Repellerelektrode („Declustering“-Potential ΔCS)^[10, 23].

In Ionenquellen, die bei Atmosphärendruck und Raumtemperatur betrieben werden, wird die Desolvatisierung pneumatisch durch Ionen-Molekül-Reaktionen mit einem Gegenstrom-Inertgas (meist Stickstoff) unterstützt („Ionspray“-Quelle; Abb. 1a)^[30, 32]. Bei einem zweiten Ionenquellentyp wird die Desolvatisierung ohne ein Gegenstromgas durch leicht erhöhte Temperatur (ca. 40–45 °C) bewirkt (Abb. 1b)^[33]. Beide Ionenquellen wurden zur Untersuchung einer Vielzahl von Biopolymeren und supramolekularen Komplexen eingesetzt. Eine Überlegenheit einer der beiden Elektrospray-Ionenquellen zur Charakterisierung nichtkovaler Komplexe wurde bisher nicht nachgewiesen, auch wenn Ionspray-Quellen überwiegend eingesetzt und bei Verwendung eines Gegenstromgases besonders schonende Desolvatisierungsbedingungen angenommen wurden^[23]. Als vorteilhaft hat sich dagegen die Verwendung eines koaxialen Flüssigkeitsstroms zusätzlich zur Probenlösung erwiesen; ein derartiges „Sheath-flow“-System, ursprünglich zur Direktkopplung von Kapillarelektrophorese und ESI-MS entwickelt^[10, 34–36], ermöglicht die Herstellung spezifischer Lösungsbedingungen (z.B. pH, Puffersalze) zur Analyse nichtkovaler Komplexe (siehe Abschnitt 2.3). Eine weitere Modifizierung der Probeneinlaßkapillare ist der Einbau einer thermostatisierbaren Mikroheizung^[17c, 24, 37] (siehe Abb. 1 b), die eine exakte Temperatursteuerung (ca. 20–80 °C) und damit beispielweise Untersuchungen der Temperaturabhängigkeit von Komplexstabilitäten ermöglicht.

Als Beispiele für die Bildung von Makromolekülionen sind in Abbildung 2 Positionenspektren von Ribonuclease A und Ribonuclease S sowie Negativionenspektren zweier synthetischer Oligodesoxyribonucleotide dargestellt. Zur ESI-MS von Peptiden und Proteinen wurden bisher vorwiegend saure wäßrige Lösungen unter Zusatz eines polaren organischen Lösungsmittels (z.B. 5–10% Methanol) verwendet, die stabile Elektrospraybedingungen ermöglichen^[8, 10, 38]. Unter diesen Bedingungen zeigt das Spektrum der RNase A eine kontinuierliche Serie protonierter Molekülionen mit der höchsten Intensität für das $[M + 9H]^{9+}$ -Ion (Abb. 2a oben); die m/z -Werte der vielfach geladenen Ionen ermöglichen eine exakte Bestimmung des Molekulargewichts ($M_r = 13\,682$)^[10, 39]. Zusätzlich tritt eine zweite Ionenserie mit um jeweils 98 Da höheren Massen auf, die der Addition eines spezifisch zwischen der S-Protein- und der S-Peptidkette der RNase A gebundenen Phosphat-Ions^[40] entspricht. Der Vergleich mit dem nichtkovalenten Komplex aus S-Protein und S-Peptid der RNase S^[41] zeigt, daß in saurer Lösung (pH 3) ausschließlich die dissoziierten Polypeptidkomponenten vorliegen. Die entsprechenden Molekülionen treten wegen der inhomogenen enzymatischen Spaltung^[42] jeweils als A/B-Doppelserien des S-Peptids (1–19/20) und des S-Proteins (20/21–124) auf (Abb. 2a unten). Bei pH 7 dagegen konnten die Molekülionen der intakten RNase S nachgewiesen werden^[43], was mit der bekannten Stabilität des Enzyms bei physiologischen pH-Bedingungen^[44] in Einklang ist.

Im Gegensatz zu Proteinen wurden Oligo- und Polynucleotidbisher überwiegend als Negativionen untersucht^[10, 45]. Dabei wurde für die Bildung der (formal deprotonierten)

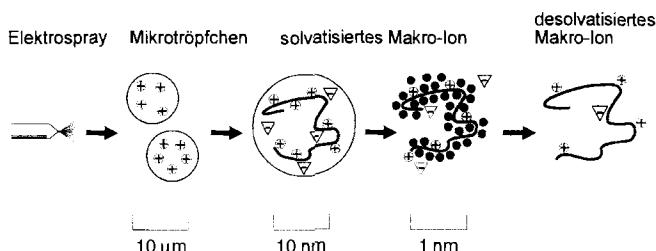
a)

Abb. 2. a) Positivionen-ESI-Massenspektrum von Rinder-RNase A (oben, $M_r = 13682$) und S (unten, $M_r = 11534$) in einer Mischung aus zweiprozentiger wässriger Essigsäure und Methanol (9:1, pH 3). b) Negativionen-ESI-Massenspektrum eines synthetischen, 24meren Oligonucleotids ($M_r = 7347$, oben) und eines 44meren ($M_r = 13504$, unten). Probenlösungen von ca. $0.1 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$ in einer Mischung aus 5 mM Ammoniumacetatlösung und Acetonitril (1:1, pH 7.5) wurden mit einer Harvard-Infusionspumpe bei einer Fließgeschwindigkeit von $4 \mu\text{L min}^{-1}$ durch die Einlaßkapillare zugeführt.

Molekülionen eine starke Abhängigkeit von den Gegenionen nachgewiesen. So zeigt das Spektrum eines als Polyammoniumsalz^[45] gereinigten 24meren Oligodesoxyribonucleotids (Erkennungssequenz des GCN4-Transkriptionsaktivators aus Hefe^[46]; siehe Abschnitt 3.2), eine homogene Serie von $[M - nH]^{n-}$ -Ionen und somit die vollständige Entfernung der Ammonium-Gegenionen im Desolvatisierungsprozeß (Abb. 2b oben). Die Synthese homogener Polyammoniumsalze erweist sich bei höhermolekularen Polynucleotiden jedoch als zunehmend schwierig^[47, 48]. In Gegenwart von Alkalimetall-Ionen treten komplexe Molekülionenaddukte auf, die deutlich schlechter nachzuweisen sind (Abb. 2b unten)^[38, 49]. Für die Analyse hochmolekularer DNA-Sequenzen sind daher leistungsfähige Reinigungsmethoden zur Abtrennung von Alkalimetall-Gegenionen entscheidend; exakte Molekulargewichts-

bestimmungen gelangen bisher bis zu Sequenzlängen von ca. 80 Basen^[45, 49].

Ein Modell für die Bildung von Makromolekülionen durch Elektrospray, in Anlehnung an den von Smith et al.^[23], Fenn^[50] und Röllgen et al.^[51] formulierten Ionenbildungsmechanismus, ist in Abbildung 3 dargestellt. Generell wird im ersten Schritt die

Abb. 3. Schematische Darstellung der Bildung von Makromolekülionen [23]. \oplus = positive Ladung, \ominus = negative Ladung, ● = Lösungsmittelmolekül. Das desolvatisierte Ion hat in diesem Fall eine Gesamtladung von 3+.

Bildung hochgeladener Mikrotröpfchen angenommen (bis zur Rayleigh-Ladungsgrenze^[31, 52]), die rasch bis zu solvatisierten Makro-Ionen verringert werden („nanodroplets“^[23]). Als wesentliche Einflüsse auf den Elektrosprayprozeß werden Coulomb-Abstoßung, Effekte des ESI-Interface^[53] (siehe Abb. 1), Temperatur, Analyt-Ladung sowie Lösungsmitteleffekte (Protonenaffinität des Lösungsmittels^[54]) diskutiert. Für die – bisher im Detail ungeklärte – Bildung freier (desolvatisierter) Ionen wurde ein „Ladungsrückstand“-Modell („charge-residue“) von Smith et al. postuliert^[23]. Ein alternativer Mechanismus ist die vor kurzem anstelle der „Ionenverdampfung“^[31] diskutierte direkte Ionenemission aus dem Flüssigkeitskonus („Taylor-cone“^[55]) an der Kapillarspitze^[56]. Dieses Modell liefert, zumindest qualitativ, eine Erklärung für die Erhaltung nicht-kovalenter Komplexe sowie für weitere charakteristische Merkmale in ESI-Spektren wie den Nachweis spezifischer Gegenionen und den Verlust anderer ursprünglicher Solvatmoleküle (z.B. NH_3 , CH_3COOH)^[10, 54, 56]. Darüber hinaus ist das Taylor-cone-Modell in Einklang mit dem Nachweis der für Strukturen in Lösung charakteristischen Ladungszustände und -verteilungen von Makro-Ionen (siehe Abschnitt 2.2). Da für die Desolvatisierung eine sehr schnelle adiabatische Abkühlung anzunehmen ist^[51], läßt sich eine Erhaltung intakter Strukturen als Voraussetzung für die Identifizierung supramolekularer Komplexe auch unter kinetisch kontrollierten Bedingungen postulieren. Experimentelle Methoden zur Aufklärung des Ionenbildungsmechanismus und zur Tertiärstrukturcharakterisierung sind noch kaum entwickelt; erste Untersuchungen sind in den folgenden Abschnitten zusammengefaßt.

2.2. Korrelation von Molekülionen-Ladungsstrukturen mit Tertiärstrukturen von Proteinen

In der ESI-MS nehmen generell die Ladungszahlen von Molekülionen mit zunehmendem Molekulargewicht stetig zu; dabei erweist sich die Zahl geladener (ionischer) Gruppen als wesentlicher Faktor für die maximale Ladung von Makromolekülionen^[10, 38, 57]. Die ersten Untersuchungen von Protei-

nen wurden meist in mäßig bis stark sauren Lösungen durchgeführt; dabei ergab sich eine grobe Übereinstimmung zwischen der Zahl basischer Aminosäurereste (Lys, Arg) und der maximalen Ladungszahl der protonierten Molekülionen. Neuere Arbeiten, insbesondere zur pH-Abhängigkeit von ESI-Massenspektren, zeigen dagegen eindeutig eine Beziehung zwischen der Ladungsverteilung (Ladungsstruktur^[26]; vgl. Abschnitt 2.1) von Molekülionen und dem Strukturzustand in Lösung^[56]. Ein Beispiel hierfür sind die Spektren des nativen und des durch Reduktion der Disulfidbrücken sowie Alkylierung irreversibel denaturierten Hühnereiweiß-Lysozyms (HEL; Abb. 4). Das Spektrum des nativen HEL (Abb. 4a) zeigt als intensivsten Peak den eines $[M + 9H]^{9+}$ -Ions und eine maximale Ladungszahl von 10+ sowie eine nur geringe pH-Abhängigkeit der stabilen

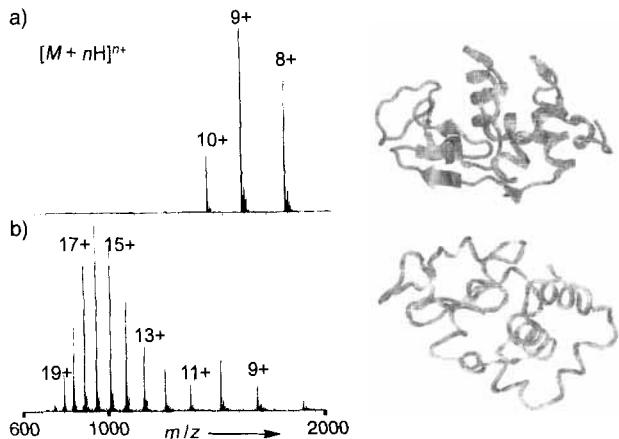


Abb. 4. ESI-Massenspektren a) von natürlichem Hühnereiweiß-Lysozym ($M_r = 14305$) und b) von DTT-reduziertem, 4-Pyridyl-ethyliertem Lysozym ($M_r = 15154$) [64]. Die Strukturdarstellungen des nativen und des denaturierten Proteins wurden der Proteinstrukturdatenbank des Brookhaven National Laboratory entnommen. Probenlösungen jeweils $0.1 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$ in Essigsäure (2proz.): Methanol (95:5, pH 3).

nativen Ladungsstruktur^[24, 58]. Im Spektrum des denaturierten Proteins (Abb. 4b) tritt eine deutliche Verschiebung der Ladungsstruktur zu höheren Ladungszahlen auf, was mit der Vergrößerung der Moleküloberfläche durch die Entfaltung der Struktur (siehe schematische Tertiärstrukturen in Abb. 4) in Einklang ist.

Ähnliche Ergebnisse wurden durch den Vergleich der Spektren von nativen Proteinen und von durch Reduktion von Disulfidbrücken^[10, 59, 60], thermisch^[61] oder durch das Lösungsmittel denaturierten Proteinen erhalten^[62]. In Übereinstimmung

hiermit wurden bei H/D-Austauschreaktionen charakteristische Unterschiede im Deuteriumeinbau für native und denaturierte Proteine nachgewiesen^[58, 63]. So wurde bei natürlichem Lysozym nach vierstündiger Deuterierung in D_2O ca. 50%, beim denaturierten Protein dagegen nahezu 90% H/D-Austausch gefunden^[60, 64]. Entsprechende Ergebnisse an Modellproteinen (Tabelle 1) stimmen gut mit NMR-spektroskopischen Daten überein^[65]. Ferner zeigen detaillierte Untersuchungen der H/D-Austauschkinetik über längere Reaktionszeiten, erstmals von Katta und Chait an Rinder-Ubiquitin durchgeführt^[63], einen erheblichen Anteil langsam austauschender Protonen in der Polypeptidkette, ebenfalls in Übereinstimmung mit NMR-Untersuchungen nativer Proteinstrukturen^[65, 66]. Aufschlußreich für die Beziehung zwischen Lösungsstrukturen und freien Molekülionen sind auch erste H/D-Austauschversuche an Molekülionen nativer und denaturierter Proteine in der Gasphase, in denen entgegengesetzte Reaktivitäten gefunden wurden (Tabelle 1). Der stärkere H/D-Austausch bei Ionen nativer Proteine wurde mit Coulomb-Effekten als Folge der kompakteren Struktur erklärt^[67, 68].

Die bisherigen Untersuchungen liefern klare Hinweise darauf, daß Tertiärstrukturunterschiede in Lösung durch die Ladungsstrukturen von Molekülionen wiedergegeben werden. Sie ermöglichen jedoch noch keinen Nachweis der Erhaltung von Tertiärstrukturen in ESI-Molekülionen in der Gasphase^[23]. Weiterführende Aussagen über die Strukturen von Makromolekülionen können durch die Charakterisierung von Ladungsstrukturen oder durch die Lokalisierung geladener Gruppen mit Hilfe chemischer Umsetzungen in situ erwartet werden; hierzu wurden ein Reaktionssystem mit zwei ESI-Einlaßkapillaren („Y-tube“^[10, 36]) und das Sheath-flow-System (siehe Abb. 1)^[36, 69] verwendet. So wurde in Umsetzungen von Proteinen mit Triethylamin oder ähnlichen Basen eine beträchtliche Verringerung der Ladungszahlen von Molekülionen durch Protonentransfer nachgewiesen, z.B. bei Myoglobin von 18fach geladenen Ionen zum $[M + 9H]^{9+}$ -Ion als dem mit dem intensivsten Peak^[10, 70].

Ein alternativer Zugang zur Charakterisierung von Tertiärstrukturunterschieden in Lösung ist die Analyse von Protein-derivaten nach selektiver chemischer Modifizierung^[24, 71]. So wurden Aminoacylierungen von Lysinresten (sowie des N-Terminus) an Proteinen bekannter Struktur durchgeführt und Umsatz sowie modifizierte Aminosäurereste durch ESI-massenspektrometrische Molekulargewichtsbestimmung und Peptide-mapping-Analyse ermittelt^[60]. RNase A und Lysozym zeigten nach partieller Acetylierung ähnliche Ladungsverteilungen der

Tabelle 1. ESI-massenspektrometrische Charakterisierung des H/D-Austauschs in nativen und denaturierten Proteinen in Lösung und in der Gasphase.

Protein	Strukturzustand	Lösung [a]			Protein	Gasphase [b]		
		%D [c]	Lit.	Strukturzustand		%D [c]	Lit.	
Lysozym	nativ	52	[60]		Proinsulin	nativ	17	[68]
Lysozym	reduziert + 4VP-alkyliert [d]	89	[64]		Proinsulin	reduziert	9	[68]
Lysozym	Glycin-amidiert [e]	54	[64]		α -Lactalbumin	nativ	45	[68]
Lysozym	Glycin-amidiert + 4VP-alkyliert	86	[64]		α -Lactalbumin	reduziert	36	[68]
Cytochrom C	nativ	48	[63]					
Cytochrom C	denaturiert	91	[63]					

[a] H/D-Austausch jeweils über 12 Stunden bei 20 °C in Deuteroessigsäure/ D_2O (1 % Säuregehalt). [b] H/D-Austausch in der Gasphase unter experimentellen Bedingungen wie in Lit. [68]. [c] Anteil der durch Deuterium ersetzen labilen Protonen. [d] Lysozym nach DTT-Reduktion und Alkylierung mit 4-Vinylpyridin. [e] Umsetzung mit Glycinmethylester/Carbodiimid [64].

Molekülionen wie die nativen Proteine, während nach Succinierung eine deutliche Verringerung der Zahl positiver Ladungen auftrat^[60]. H/D-Austauschuntersuchungen mit partiell amidierten und unmodifizierten Proteinen (vgl. Tabelle 1) ergaben vergleichbaren Deuteriumeinbau; auch CD-spektroskopisch^[72] sind keine Strukturunterschiede nachweisbar. In Übereinstimmung damit konnten von acetylierten Myoglobinen unter schonenden Desolvatisierungsbedingungen (siehe Abb. 6) Molekülionen der intakten Hämproteinkomplexe nachgewiesen werden. Ein direkter Nachweis der Erhaltung intakter Tertiärstrukturen gelang kürzlich bei partiell acylierten Derivaten des Ionenkanalproteins Porin aus *R. capsulatus* durch massenspektrometrische und röntgenkristallographische Charakterisierung; ein tetra-succinyliertes Porin konnte als intakter Tri merkomplex isomorph zum nativen Protein kristallisiert werden^[73]. In Untersuchungen von Proteinen nach selektiver Modifizierung von Argininresten mit 1,2-Cyclohexandion zu *N*⁷,*N*⁸-(Dihydroxycyclohexandiyl)-Addukten (DHCH-Arg) konnte gezeigt werden, daß die Ladungsstrukturen der Molekülionen detaillierte Aussagen über Strukturunterschiede in Lösung ermöglichen^{[24], [71]} (Abb. 5). Der Verlauf der DHCH-Arg-Modifizierung von Lysozym wurde direkt durch ESI-MS analysiert und ergab bis zur spezifischen Umsetzung von vier Argininresten die gleichen Ladungsverteilungen der Molekülionen wie beim nativen Protein^[24]. Alle unter diesen Bedingungen umgesetzten Argininreste verfügen über geeignete intra-

molekulare Protonenacceptorgruppen^[71] (in Abb. 5b am Beispiel der Tertiärstrukturumgebung von Arg⁵ und Arg¹²⁵ dargestellt). ESI-Massenspektren von Lysozym nach Umsetzung weiterer Argininreste (längerer Reaktionszeiten) zeigten dagegen zusätzlich Ionen höherer Ladungszustände, die einer zunehmenden Entfaltung und Denaturierung entsprechen (Abb. 5a).

Nach den bisherigen Ergebnissen scheint die Analyse definierter Strukturänderungen besonders geeignet zur Charakterisierung der Beziehung zwischen den Strukturen von Proteinen in Lösung und als ESI-Molekülionen. Das in Abbildung 1 dargestellte Sheath-flow-System läßt sich zu proteinchemischen und enzymatischen Umsetzungen *in situ* heranziehen^[24]. Als Beispiel ist in Abbildung 6 die ESI-massenspektrometrische Analyse der pH-abhängigen Renaturierung und Bildung des intakten Hämproteins von Myoglobin wiedergegeben, einem der ersten durch ESI-MS identifizierten nichtkovalenten Komplexe^{[10], [74]}. Der intakte Hämproteinkomplex ist bei pH 6 anhand des intensiven $[M + 9H]^{9+}$ -Peaks nachweisbar, während in saurer Lösung (pH 4) seine partielle Dissoziation zu Ionenserien des Hämproteins (HP) und des Apoproteins (AP) führt; bei pH 2 treten ausschließlich hochgeladene Ionen des Apoproteins sowie das Molekülion des freien Fe^{III}-Porphyrins (*m/z* 616) auf (Abb. 6a–c). Bei der pH-abhängigen Renaturierung des isolierten Apomyoglobins treten nahezu identische Molekülionenverteilungen wie beim Hämprotein auf (Abb. 6d–f). Das Apoprotein zeigt bei pH 6 ebenfalls als intensivsten Peak den für das $[M + 9H]^{9+}$ -Ion und läßt sich durch Zusatz von Hämporphyrinlösung zum intakten Hämprotein rekonstituieren (Bildung des analogen Molekülions $[M + 9H]^{9+}$ (HP), Abb. 6g).

Auch aus weiteren Modelluntersuchungen ergibt sich eindeutig eine Korrelation zwischen den Ionenladungsstrukturen in ESI-Massenspektren und den Strukturen nichtkovaler Komplexe von Biopolymeren in Lösung^{[23], [24]}. Dabei muß berücksichtigt werden, daß bisher überwiegend relativ hochgeladene Ionen im begrenzten Massenbereich von Quadrupolanalysatoren untersucht wurden. Die Charakterisierung von Ionen niedriger Ladungszahlen (hoher *m/z*-Werte) und deren mögliche Energieunterschiede oder höheren Stabilitäten sollten für künftige Arbeiten von großem Interesse sein^{[75], [76]} (siehe Abschnitt 3.2). Hierzu stehen seit kurzem ESI-Quellen für Flugzeitmassenspektrometer und hochauflösende Sektorfeldgeräte zur Verfügung^[77].

2.3. Voraussetzungen für die Charakterisierung von supramolekularen Komplexen

Neben den in Abschnitt 2.1 diskutierten instrumentellen Bedingungen müssen für die direkte Analyse supramolekulärer Komplexe von Biopolymeren eine Reihe weiterer Voraussetzungen erfüllt sein, insbesondere die Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen spezifischer Komplex- und unspezifischer Assoziationsbildung sowie zwischen nichtkovalenten Komplexen und kovalenten Addukten. Die Bildung unspezifischer Assoziate kann prinzipiell in Lösung oder unter den Elektrospray-Ionisierungsbedingungen erfolgen. Bei anderen Ionisierungsmethoden (FAB-MS, MALDI-MS^{[5], [9], [11]}) zeigen sich diese beispielsweise

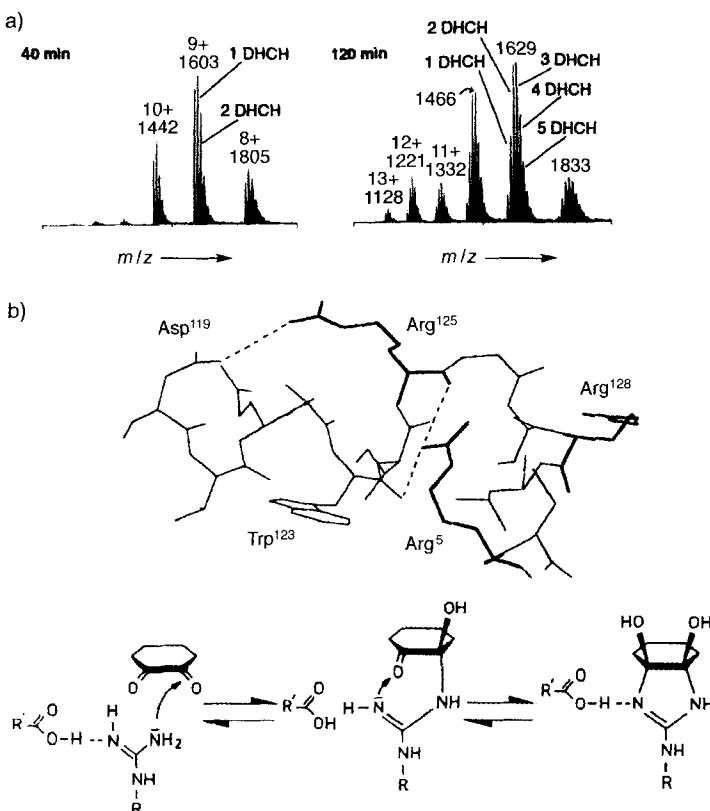


Abb. 5. a) ESI-Massenspektren von partiell DHCH-Arg-modifiziertem Lysozym, b) Tertiärstruktur des Enzyms im Bereich der Aminosäurereste Arg⁵ und Arg¹²⁵ und Derivatisierungsreaktion. Natives HEL wurde mit 50 Moläquiv. 1,2-Cyclohexandion in Natriumboratlösung (pH 8.5) umgesetzt, und die Proteinderivate wurden nach unterschiedlichen Reaktionszeiten isoliert [71]. Zur ESI-MS wurde jeweils Essigsäure (2proz.):Methanol (95:5) verwendet.

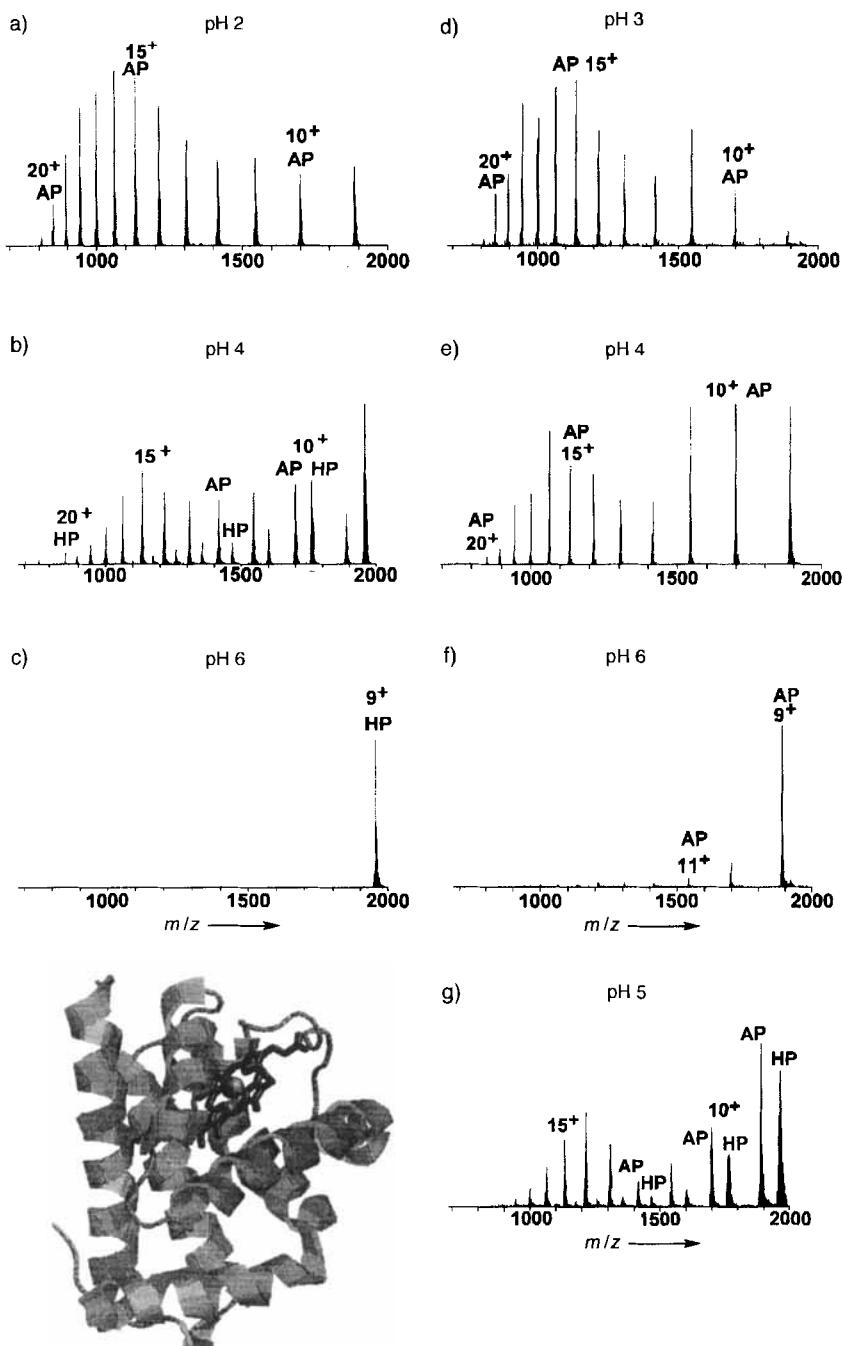


Abb. 6. ESI-massenspektrometrische Analyse von Häm-Myoglobin (HP) bei mehreren pH-Werten (links) und pH-abhängige Renaturierung von Apomyoglobin (AP, rechts). a)–c) Spektren nach Dissoziation des Hämproteins durch Ansäuern mit Essigsäure/Ammoniumacetat (5 mM); d)–f) Spektren nach Renaturierung des Apoproteins (Ammoniumacetat); g) Spektren nach Rekonstitution von Häm-Myoglobin durch Zusatz von Hämoporphyrinlösung (pH 5). Alle Spektren wurden in Ammoniumacetat (5 mM):Methanol (95:5) aufgenommen. Die Darstellung der kompakten Tertiärstruktur des intakten Hämproteins unten links wurde der Kristallstrukturdatenbank des Brookhaven National Laboratory entnommen (aus Lit. [24]).

als dimere „Clusterionen“, während in ESI-Massenspektren von Biopolymeren Assoziate mit Komponenten der Probenlösung wie Gegenionen, Puffer- und Tensidmolekülen auftreten können^[10, 76]. Die Ionenintensitäten derartiger Addukte sind wesentlich von den relativen Bindungsstärken abhängig (z.B. bei hydrophoben Wechselwirkungen in Proteinen). Ein Beispiel von analytischer Bedeutung ist die Komplexierung von Proteinen mit Na-

triumdodecylsulfat (SDS). Entsprechende Ionenassoziate von Lysozym mit bis zu zehn Dodecylsulfat-Ionen wurden bereits bei geringen SDS-Konzentrationen nachgewiesen; sie führen zu einer erheblichen Verschiebung der Ladungsverteilung und zur Überlagerung von Peaks der protonierten Molekülionen^[78] (Abb. 7). We-

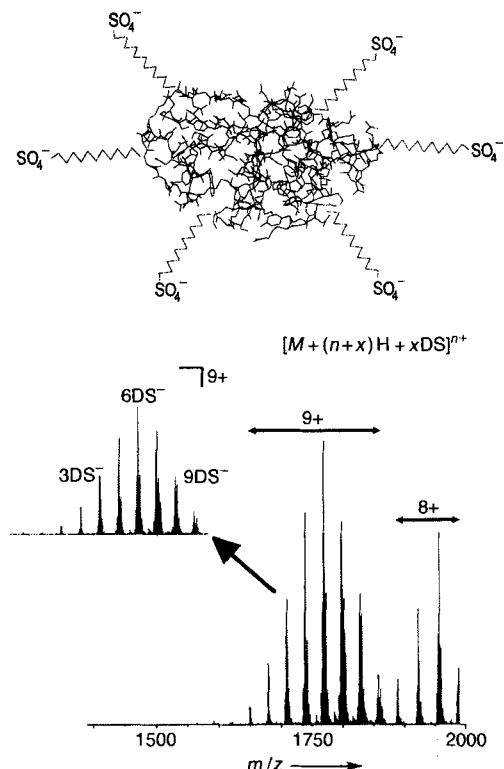


Abb. 7. Oben: Strukturmodell des Komplexes aus HEL und sechs Dodecylsulfat-Ionen (DS^-). Unten: ESI-Massenspektrum von mit Dodecylsulfat kontaminiertem HEL [79]. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt die Serie der neunfach geladenen $[M + (n+x)\text{H} + x\text{DS}]^{n+}$ -Ionen; Lösungsmittel: Essigsäure (2proz.):Methanol (9:1).

gen der breiten Anwendung der SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) als Trenn- und Isolierungsmethode in der Proteinanalytik sind Effekte durch Kontamination mit SDS und geeignete Reinigungsverfahren im Hinblick auf die ESI-massenspektrometrische Analyse von Proteinen von großem Interesse. Zur Abtrennung von SDS haben sich klassische Verfahren (Ionenpaareextraktion) als wenig erfolgreich erwiesen^[45, 79]; als effiziente Reinigungsmethoden nach der Isolierung von Proteinen durch SDS-PAGE konnte vor kurzem eine direkte Elektroelution entwickelt werden^[79].

Nichtkovalente Komplexe, z.B. aus Enzymen und Substrat- oder Inhibitorkomponenten, wurden in den ersten Untersuchungen meist anhand spezifischer Ionen des Komplexes (Molekulargewichtszunahme) nachgewiesen^[23] (siehe Abschnitt 3.1). Eine eindeutige Unterscheidung zwischen spezifischer nichtkovalenter Wechselwirkung und kovalenter Bindung bereitet jedoch oft erhebliche Probleme und erfordert eine detaillierte

Charakterisierung von Struktur und Bildungsmechanismus des Komplexes. Ein Beispiel hierfür ist die ESI-massenspektrometrische Analyse von Komplexen aus Lysozym und Oligosacchariden oder strukturanalogen Inhibitoren^[80]. Die Umsetzung von HEL mit dem Substrat Hexa- β -(1-4)-N-acetylglucosamin (NAG_6) wurde direkt durch ESI-MS verfolgt; dabei traten schnell die Ionen des Enzym-Substrat-Komplexes auf ($M_r = 15\,542$). Im weiteren Verlauf der Reaktion waren zusätzlich die Ionen des Komplexes mit dem Hydrolyseprodukt Tetra-N-acetylglucosamin (NAG_4) nachweisbar, das ähnlich gut am aktiven Zentrum des Enzyms gebunden wird^[81]. Der Nachweis der spezifischen nichtkovalenten Komplexe wurde durch Kompetitionsversuche mit mehreren Oligosaccharid-Substraten abgesichert, die an zwei Untereinheiten des katalytischen Zentrums binden^[72, 82], sowie durch die Komplexbildung mit einem hochaffinen Inhibitor (Oligo-N-acetylchitotetraose). Die Dissoziation der Enzym-Substrat-Komplexe wurde ferner durch das vollständige Verschwinden der Ionen unter drastischen Desolvatisierungsbedingungen nachgewiesen (höheres Declustering-Potential ΔCS). Ein anderes Verhalten zeigten dagegen Oligosaccharidkomplexe mit einer Lysozym-Mutante, in der der Asp⁵²-Rest im aktiven Zentrum durch Serin ersetzt war (D52S-HEL); diese Punktmutation führt zum vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität bei Erhaltung der Substratbindungsaffinität^[83]. Die D52S-HEL-Mutante lieferte mit dem Substrat NAG_6 sowie mit NAG_4 stabile Molekülionen, die durch Variation des Lösungsmittels oder der Desolvatisierungsbedingungen nicht dissoziert werden konnten (Abb. 8). Aufgrund der identifizierten Molekulargewichte und der Stabilität der Komplexe wurde die Bildung eines kovalenten Addukts als Halbacetal von Ser⁵² mit der reduzierenden Gruppe des Oligosaccharids postuliert^[83, 84].

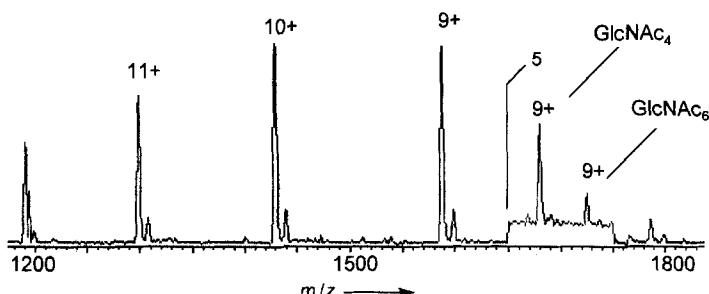


Abb. 8. ESI-Massenspektrum der Addukte der rekombinanten Lysozym-Mutante D52S-HEL mit Oligo- β -(1-4)-N-acetylglucosamin. Die vergrößert wiedergegebenen Peaks entsprechen den Addukten von $[M + 9\text{H}]^{9+}$ -Ionen mit dem Tetra- bzw. Hexasaccharid (GlcNAc₄, GlcNAc₆) (aus Lit. [83]).

Eine eindeutige Unterscheidung von nichtkovalenten und kovalenten Komplexen durch Molekulargewichtsbestimmungen ist mit Quadrupol-Massenspektrometern niedriger Auflösung häufig nicht möglich und erfordert weiterführende Untersuchungen oder die Anwendung von Trennmethoden zusätzlich zur ESI-MS. Das gleichzeitige Vorliegen von kovalenten Addukten und nichtkovalentem Komplex konnte in Untersuchungen der Bindung des Cofaktors Glutathion (GSH) an eine bakterielle Glutathion-S-Transferase nachgewiesen werden (GST aus *S. japonicum*^[85]). ESI-Massenspektren der GST nach affinitätschromatographischer Isolierung an Glutathion-Sepharose

in Gegenwart von GSH zeigten zwei Hauptserien von Molekülionen, die der Addition von zwei bzw. drei GSH-Molekülen an die Proteinkette entsprechen (Abb. 9 Mitte)^[86]. Ein erheblicher Teil des gebundenen GSH konnte durch Dialyse nicht abgetrennt werden; eine homogene Serie von $[M + n\text{H}]^{n+}$ -Ionen und das exakte Molekulargewicht des freien Enzyms ($M_r = 26\,898$) wurden erst nach mehrmaliger Reduktion mit Dithiothreitol (DTT) und Dialyse erhalten (Abb. 9 unten). Die Identifizierung der kovalenten Addukte als gemischte Disulfide und der modifizierten Cysteinreste (unter anderem Cys¹³⁸^[16, 86], Abb. 9 oben) gelang vor allem durch massenspektrometrische Peptide-Mapping-Analyse.

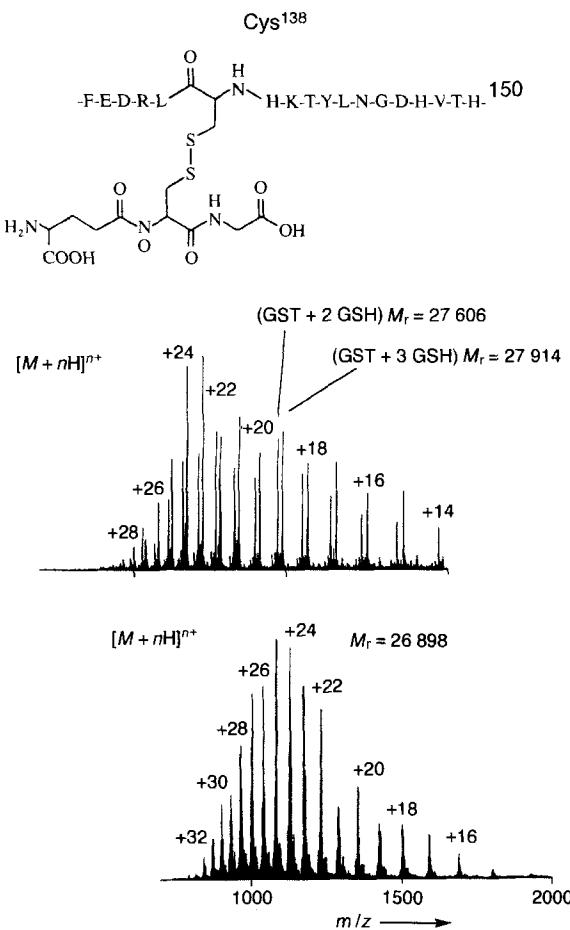


Abb. 9. ESI-massenspektrometrische Charakterisierung der Komplexe aus rekombinanter Glutathion-S-Transferase (*S. Japonicum*) aus *E. coli* und Glutathion. Mitte: Spektrum von GST nach Isolierung durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose; unten: Spektrum des homogenen Proteins nach mehrmaliger Reduktion mit DTT und Dialyse [86]. Das oben dargestellte Peptidfragment (133–150) der GST mit dem Cys¹³⁸-Glutathionyl-disulfid wurde durch massenspektrometrische Peptide-Mapping-Analyse identifiziert [86a].

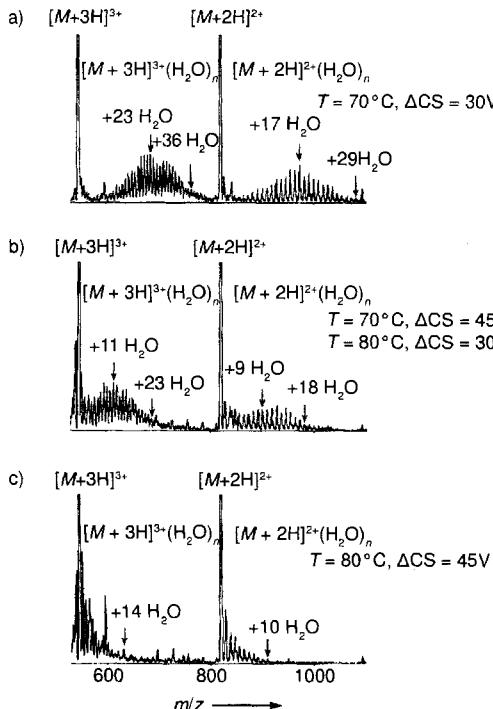
Experimentelle Parameter zur und Kriterien für die Identifizierung von nichtkovalenten Komplexen und deren Einfluß auf die Ionenbildung im ESI-Spektrum sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Eine wesentliche Bedingung für das Vorliegen einer spezifischen Komplexbildung ist eine definierte – oder zumindest überwiegende – Stöchiometrie der Komplex-Ionen im Vergleich zu den Ionen der Komponenten. Bei den in Tabelle 2 genannten Verfahren muß jedoch berücksichtigt werden, daß

Tabelle 2. Experimentelle Parameter zur und Kriterien für die ESI-massenspektrometrische Identifizierung von supramolekularen Komplexen.

Kriterien für das Vorliegen von nichtkovalenten Komplexen	Verfahren zur Dissoziation von Komplex-Ionen
spezifische Komplexstöchiometrie/Gleichgewicht der Komplexbildung	Änderung der Stöchiometrie der Komplexkomponenten, Erhöhung der Interface-Temperatur, Erhöhung des Desolvatisierungspotentials ΔCS
Kompetition von Komplexkomponenten	chemische Modifizierung, spezifische Strukturvariation
Spezifität der Lösungsbedingungen	pH-Änderung, Änderung des Puffersalzes, Konzentrationsänderung
Gasphasenstabilität der Komplex-Ionen	Erhöhung des Desolvatisierungspotentials ΔCS , stoßinduzierte Dissoziation (Gegenstromgas)

Änderungen der Lösungsbedingungen die Ionenbildung in ESI-Massenspektren beeinflussen können. Eine quantitative Charakterisierung von Komplexbildungsgleichgewichten anhand von Ionenintensitätsverhältnissen wurde erst jüngst an Modellsystemen durchgeführt (siehe Abschnitt 3.1). Für die Analyse nichtkovalenter Komplexe ist daher beim derzeitigen Entwicklungsstand der ESI-MS die vergleichende Anwendung von Standardmethoden (z.B. Ultrazentrifugieren, native Gelelektrophorese) von besonderer Bedeutung.

Zur Bestimmung der Stabilität von Ionen nichtkovalenter Komplexe in der Gasphase und zur Identifizierung von möglichen Artefakt-Ionen wurden modifizierte Elektrospray-Bedingungen und die stoßinduzierte Dissoziation herangezogen^[10]. Als wichtige Einflüsse auf die Stabilität nichtkovalenter Komplexe haben sich Gegenstromgas, Temperatur der Ionisierungs-

Abb. 10. ESI-Massenspektren von Addukt-Ionen des Peptids Somatostatin ($M_r = 1638$) mit Wasser bei mehreren Declustering-Potentialen ΔCS und Ionenquellen-temperaturen T . Die Peaks der desolvatisierten Molekilionen $[M + 2H]^{2+}$ und $[M + 3H]^{3+}$ sind jeweils übersteuert wiedergegeben (aus Lit. [23]).

kammer und Verweilzeit (Extraktionspotential) im Bereich der Desolvatisierung erwiesen^[23, 24]. Dabei ermöglichen schonende Desolvatisierungsbedingungen eine direkte Identifizierung von Lösungsmitteladdukten. So konnten im Spektrum des Polypeptids Somatostatin bei unvollständiger Desolvatisierung Addukt-Ionen mit bis zu 40 H₂O-Molekülen nachgewiesen und durch Erhöhung des Declustering-Potentials ΔCS sowie durch Temperaturerhöhung dissoziert werden^[23, 87] (Abb. 10). Optimierte, milde Desolvatisierungsbedingungen sind nach den bisherigen Modelluntersuchungen entscheidend für die Erhaltung von makromolekularen Komplexen. Bei hohen ΔCS -Potentialen (> 100 V) werden dagegen auch kovalente Bindungen gebrochen^[10, 24].

3. Anwendungen der Elektrospray-Massenspektrometrie zur Charakterisierung supramolekularer Komplexe von Biopolymeren

3.1. Proteinkomplexe mit niedermolekularen Liganden

Erste Anwendungen der ESI-Massenspektrometrie zur Charakterisierung von Proteinkomplexen mit niedermolekularen Liganden wurden innerhalb kurzer Zeit veröffentlicht^[23, 88, 89]. Beispiele von Komplexen mit verschiedenen Liganden wie Substraten, Cofaktoren und Inhibitoren, die nachgewiesenen Stöchiometrien sowie die Ladungszahlen der spezifischen Komplex-Ionen sind in Tabelle 3 wiedergegeben (siehe auch Abb. 6 und 9). Die bisher identifizierten Komplexe sind durch ionische,

Tabelle 3. ESI-massenspektrometrische Identifizierung von Proteinkomplexen mit niedermolekularen Liganden.

Protein	M_r [a]	Ligand	Komplex	Lit.		
		M_r [b]	Ladung [c]	Stöchiometrie [d]		
Rubredoxin	5937	Fe ^{III}	5989	4+	1:1	[90]
Ferredoxin	10828	Fe ^{III} S	11178	4+	1:4	[90]
HIV-Nucleocapsid	6444	Zn ^{II}	6576	6+	1:2	[91]
Lysozym	14305	GlcNac _n [e]	15544	8+	1:1	[88]
Lysozym	14305	TACL [f]	15136	8+	1:1	[88]
Myoglobin	16951	Fe-Häm	17568	9+	1:1	[24, 72]
Ras-Onkogen [g]	18852	GDP	19295	9+	1:1	[89]
HIV-1-Protease [h]	10747	JG-365 [i]	22345	10+	2:1	[92]
Aldose-Reduktase	35779	NADPH	36527	33+	1:1	[93]

[a] Molekulargewicht der Apoproteinform. [b] Molekulargewichtsbestimmung aus den $[M + nH]^n$ -Ionen des Proteinkomplexes. [c] Ladungszahl des $[M + nH]^n$ -Ions, das dem Peak höchster Intensität entspricht. [d] Nachgewiesene Protein:Ligand-Stöchiometrie. [e] Hexa-N-acetylglucosamin. [f] Tetra-N-acetylchitotetraose- δ -lacton. [g] Rekombinante Sequenz (1–166) des humanen Ras-Onkogens. [h] Synthetische [Aba^{67, 95}]-HIV-1-Protease [94]. [i] Synthetischer Peptidinhibitor (Ac-Ser-Leu-Asn-Phe- Ψ [CH(OH)CH₂N]-Pro-Ile-Val).

koordinative und Wasserstoffbrückenbindungen sowie durch überwiegend hydrophobe Wechselwirkungen gekennzeichnet. Ferner lässt der bei Komplexen mit bekannten Strukturen und Bindungseigenschaften nachgewiesene weite Bereich von Dissoziationskonstanten (ca. 10^{-11} – 10^{-7} M) ein breites Anwendungspotential der ESI-MS erkennen.

Die Molekulargewichtsunterschiede zwischen freiem Protein und Proteinkomplex waren in den bisherigen Untersuchungen ausreichend groß, um eine eindeutige Bestimmung der Komplex-Molekulargewichte (oder -Ladungszahlen) und Stöchiometrien zu ermöglichen (Tabelle 3). Dabei sind jedoch die Begrenzungen im Massenbereich in der Genauigkeit der Massenbestimmung und in der Auflösung von Quadrupolgeräten zu berücksichtigen, die bei Komplexen hochmolekularer Proteine (> 50 kDa) zunehmend Analysatoren für hohe Massenbereiche oder hochauflösende Geräte erfordern (siehe Abschnitt 3.2). Trotz dieser Einschränkungen konnten spezifische Komplexe mehrerer Modellproteine (Hämproteine, Protein-Nucleotid-Komplexe) sowie komplexere, mit konventionellen Methoden nicht nachweisbare Bindungsstrukturen identifiziert werden; ein Beispiel hierfür ist die Bindung von Zn^{II} -Ionen an zwei Bindungsstellen eines Polypeptids des HIV-Nucleocapsids^[91]. In Untersuchungen von synthetischen Peptidinhibitoren der HIV-1-Protease^[92] konnten Bacal und Kent den ternären Protease-Inhibitor-Komplex einer synthetischen Mutante der HIV-Protease identifizieren (Aba⁶⁷C, Aba⁹⁵C; siehe Tabelle 3). Die anhand der spezifischen Molekülionen nachgewiesene Stöchiometrie des Komplexes aus zwei Protein-Untereinheiten^[93] bestätigte zugleich die aktive dimere Form des Enzyms, bei dem jeweils ein Asparaginsäurerest einer Untereinheit zum katalytischen Zentrum beiträgt^[96].

Nahezu alle bisher untersuchten Proteinkomplexe zeigen gegenüber den Ionenladungen der Apoproteine^[23] deutliche Verschiebungen der Ladungsverteilung protonierter Molekülionen zu niedrigeren Ladungszahlen (höheren m/z -Werten, Tabelle 3). Entsprechende „Neutralisierungseffekte“ wurden bei Biopolymerkomplexen, bei Komplexen mit niedermolekularen Liganden und bei synthetischen supramolekularen Komplexen nachgewiesen. In Geräten mit begrenztem Massenbereich kann dies zu erheblichen Problemen bei der Identifizierung spezifischer Komplex-Ionen führen^[24] (siehe Abschnitte 3.2 und 3.3). Über den Einfluß der Bildung von Biopolymerkomplexen auf die Struktur und Verteilung von Ionenladungen liegen bisher nur geringe Kenntnisse aus unabhängigen analytischen Methoden vor, so daß hier systematische Untersuchungen durch ESI-MS erforderlich sind. Ein weiteres Problem bei Proteinkomplexen mit Metallionen als Liganden ist die eindeutige Identifizierung des Oxidationszustands der Liganden aus der Ladungsverteilung der Komplex-Ionen (oder eine mögliche Änderung des Oxidationszustands unter den ESI-Bedingungen)^[23, 88]. So konnten Van Dorsselaer et al. in Untersuchungen von Eisen-Protein-Komplexen durch exakte Massenbestimmung der protonierten Molekülionen die Komplexe des Fe^{III} -Rubredoxins mit vier Cystein-Thiolatoliganden sowie das Tetraferriotetrathiolatoferredoxin nachweisen (Abb. 11); die Ionenzusammensetzungen dieser Komplexe ergaben jeweils den authentischen Oxidationszustand in Lösung^[90]. Dagegen lieferten Untersuchungen der Hämprotein-Komplexe mit α -/β-Hämoglobin Hinweise auf eine Oxidation des Fe^{II} - zum Fe^{III} -Porphyrin unter den ESI-MS-Bedingungen^[88a].

Modelluntersuchungen mit und bisherige Anwendungen der ESI-MS waren nahezu ausschließlich auf die qualitative Identifizierung von Proteinkomplexen beschränkt. Zur Charakterisierung von pH-, temperatur- und konzentrationsabhängigen Gleichgewichten bei der Komplexbildung wurden bisher nur

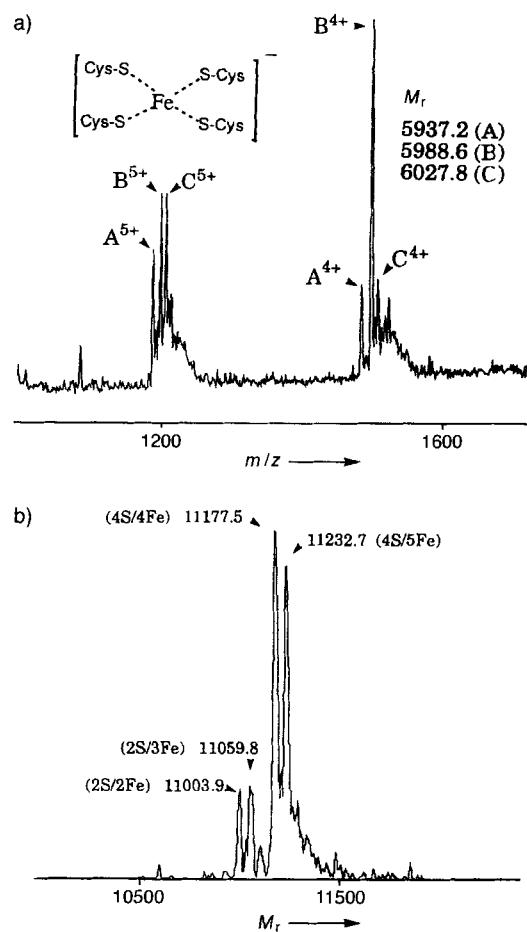


Abb. 11. ESI-massenspektrometrische Identifizierung von Eisen-Protein-Komplexen. a) Spektrum von Rubredoxin in H_2O :Meethanol (1:1). A = Aporubredoxin, B = Holorubredoxin mit Fe^{III} -Cystein-Tetrathiolatoligand, C = Holorubredoxin-Kalium-Addukt. b) Spektrum des Eisen-Ferredoxin-Komplexes nach Transformation in die Massenskala. Der Molekülionenpeak höchster Intensität entspricht dem Tetraferriotetrathiolatokomplex (4S/4Fe, $M_r = 11178$) (aus Lit. [90]).

wenige Untersuchungen durchgeführt wie die zur pH-Abhängigkeit der Spektren von Myoglobin (Abb. 6) und zur Charakterisierung des RNase-S-Komplexes^[24, 43]. Die Bestimmung von thermodynamischen Stabilitäten und Komplexbildungskonstanten in Lösung (wie von Orgorzalek-Loo et al. für RNase S abgeschätzt^[43]) ist zur Zeit noch im Anfangsstadium. Erste Untersuchungen lieferten jedoch Hinweise auf entsprechende Anwendungsmöglichkeiten der ESI-MS. So konnten in Gemischen aus Alkalimetall-Ionen und Kronenethern ([18]Krone-6) die Komplexbildungskonstanten aus den Intensitätsverhältnissen der Komplex-Ionen in guter Übereinstimmung mit den Literaturdaten bestimmt und eine Korrelation der Ionenintensitäten mit den Solvationsenergien der Komplexe ermittelt werden^[97a]. Auch bei Kronenether-modifizierten Peptiden konnte durch ESI-MS – sowie in FAB-Massenspektren – eine quantitative Übereinstimmung zwischen den Molekülionenintensitäten der Komplexe mit Alkalimetall-Ionen und den unabhängig bestimmten Komplexbildungskonstanten nachgewiesen werden^[97b]. Aufgrund dieser jüngsten Ergebnisse scheint die weitere Entwicklung und Erprobung der ESI-Methode zur quantitativen Analyse von Komplexbildungsgleichgewichten vielversprechend, z.B. unter Verwendung von Kronenetherderivaten zur selektiven Ionenmarkierung.^[97]

3.2. Identifizierung von supramolekularen Proteinkomplexen

Wie in Abschnitt 2.3 dargestellt, ist neben dem Nachweis einer nichtkovalenten Bindung die Möglichkeit der Differenzierung von spezifischen Komplex-Ionen und unspezifischen Aggregaten eine wesentliche Voraussetzung für die Identifizierung von supramolekularen Komplexen. Erste Untersuchungen wurden daher an Proteinen durchgeführt, bei denen die Bildung von Dimeren bekannter Struktur zu spezifischen Molekülionen führt (im Gegensatz zu den in FAB- und MALDI-Massenspektren beobachteten unspezifischen oligomeren Clusterionen^[5, 11]). Der Nachweis eines Dimers anhand einer Serie vielfach geladener Ionen durch ESI-MS ist schematisch in Abbildung 12 am Beispiel eines dimeren Leucinzipperproteins

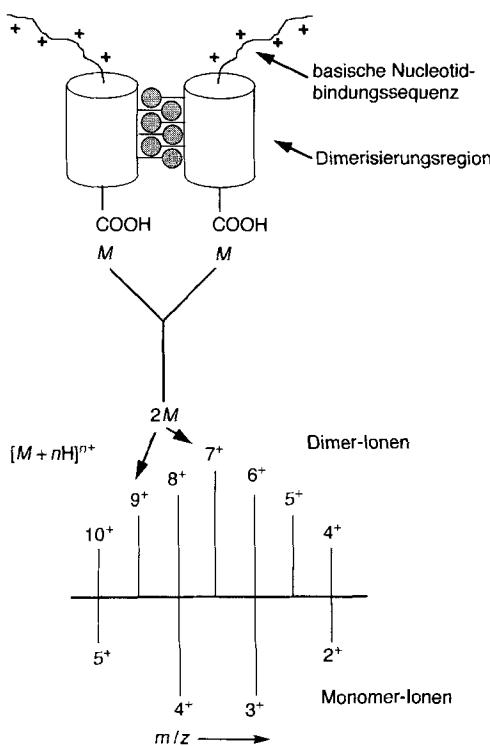


Abb. 12. Prinzip der ESI-massenspektrometrischen Identifizierung von Proteindimeren am Beispiel der $[M + nH]^n+$ -Serie eines homodimeren Leucinzipperproteins.

dargestellt. Generell folgt das Vorliegen eines Oligomers aus identischen Polypeptidketten eindeutig aus einem nicht ganz-zahligen Verhältnis von Molekülionen-Ladungszahl zu Zahl der Komplexkomponenten^[24, 45b]. Homodimere Polypeptide sind daher durch Molekülionen mit ungeraden Ladungszahlen charakterisiert. Entsprechendes gilt für den Nachweis von Duplex-Polynukleotiden aus Einzelstrangkomponenten identischer Basenzusammensetzung (siehe Abschnitt 3.3).

Leucinzipperproteine haben in den letzten Jahren wegen ihrer Bedeutung für die Regulierung der DNA-Transkription sowie ihrer – bisher nicht im Detail aufgeklärten – Struktur und ihrer Erkennungsspezifität durch Komplexierung von DNA-Sequenzen großes Interesse gefunden^[98, 99]. Die charakteristischen Leucinzipper-Strukturelemente mit regelmäßigen Heptadensequenzen von Leucinresten sowie basischen, DNA-bindenden Einheiten (siehe Abb. 12 und 13) wurden in einer Reihe von

Transkriptionsaktivatoren^[46] sowie in ribosomalen RNA-bindenden Proteinen nachgewiesen^[100]. Die bisher am besten charakterisierte Struktur, die des GCN4-Transkriptionsaktivators aus Hefe (GCN4-Leucinzipper^[46]), besteht aus einem α -helicalen „Coiled-coil“-Doppelstrangkomplex mit einer 4-3-Heptadensequenz aus hydrophoben und polaren Aminosäureresten. Obwohl die Bindung einer spezifischen DNA-Sequenz (Palindrom-Nukleotid, siehe Abb. 17) die Dimerisierung induziert und eine Stabilisierung der komplementären Proteinkonformation bewirkt^[98, 101], konnten stabile Dimere von Leucinzipperpeptiden hergestellt werden^[102]. Eine Reihe von Leucinzipperpolypeptiden wurde spektroskopisch (CD, NMR^[102, 103]) und die GCN4-Sequenz durch Röntgenkristallographie^[104] charakterisiert. Wesentliche Strukturdetails und Voraussetzungen für die Strukturspezifität der Bildung von Protein-Nukleotid-Komplexen sind bisher jedoch ungeklärt, so daß eine direkte massenspektrometrische Charakterisierung von großem Interesse ist.

Erste ESI-Massenspektren von Dimeren eines Leucinzipperpeptids wurden von Li et al. erhalten^[105]. Die Dimer-spezifischen $[M + 5H]^{5+}$ - und $[M + 7H]^{7+}$ -Ionen konnten nur mit geringen Intensitäten neben den geradzahlig geladenen Molekülionen des Monomers nachgewiesen werden, was eine geringe Stabilität der Komplexe mit hydrophoben Wechselwirkungen unter den ESI-Bedingungen andeutet; ihre Identifizierung wurde jedoch durch stoßinduzierte Fragmentierung und Tandem-MS-Analyse gesichert^[106]. Systematische Untersuchungen wurden an einer Reihe von synthetischen Polypeptiden durchgeführt, die die Leucinzipper-Dimerisierungsregion und DNA-bindende Sequenzen enthielten^[24, 107, 108]. Das ESI-Massenspektrum eines GCN4-Polypeptids (Abb. 13) enthält bei milden Desolvatisierungsbedingungen ($\Delta CS \approx 5-10$ V) einen intensiven Peak für das fünffach geladene Molekülion des Dimers (M_2) bei m/z 1616 ($M_r = 8078, (2 \times 4039 + 5)/5 = 1616.6$). Die Ladungszahlen der Ionen bei m/z 1347 und 1010 lassen sich formal dem Monomer und/oder Dimer zuordnen ($M^{3+}/(M_2)^{6+}$ bzw. $M^{4+}/(M_2)^{8+}$; siehe auch Abb. 14)^[107]. Das Vorliegen eines nichtkovalenten Komplexes wird durch die vollständige Dissoziation des dimeren $[M + 5H]^{5+}$ -Ions bei höherem Desolvatisierungspotential bestätigt ($\Delta CS \approx 60$ V), während die Intensitäten der Monomer-Ionen unter diesen Bedingungen unverändert bleiben (Abb. 13 unten rechts). In Übereinstimmung damit wurden bei zunehmender Peptidkonzentration (ca. 100 μM) erhöhte Intensitäten des Dimerpeaks nachgewiesen, während sich die Variation der Temperatur der Einlaßkapillare (ca. 30–70 °C) nur wenig auf das Monomer/Dimer-Verhältnis auswirkt^[108a]. Eine quantitative Bildung des Dimers konnte unter den bisher angewandten Bedingungen nicht erzielt werden; weitere Untersuchungen zeigten^[108], daß eine partielle Dissoziation von Leucinzipperkomplexen durch Adsorption an der polaren Kapillaroberfläche des Einlaßsystems auftritt.

Die Eignung der ESI-MS zur Charakterisierung von supramolekularen Leucinzipperstrukturen konnte in weiteren Untersuchungen von Coiled-coil-Polypeptidsequenzen gezeigt werden, von denen ein serinhaltiges Polypeptid („coil-Ser“, siehe Abb. 14) kristallisiert und durch Röntgenstrukturanalyse als dreisträngiger Komplex aufgeklärt wurde^[109]. Trimere Komplexe von Coil-Ser sowie analogen Polypeptiden wurden ESI-massenspektrometrisch anhand der spezifischen (M_3)⁵⁺-Ionen identifiziert; ihr Vorliegen wurde durch unabhängige Analyse

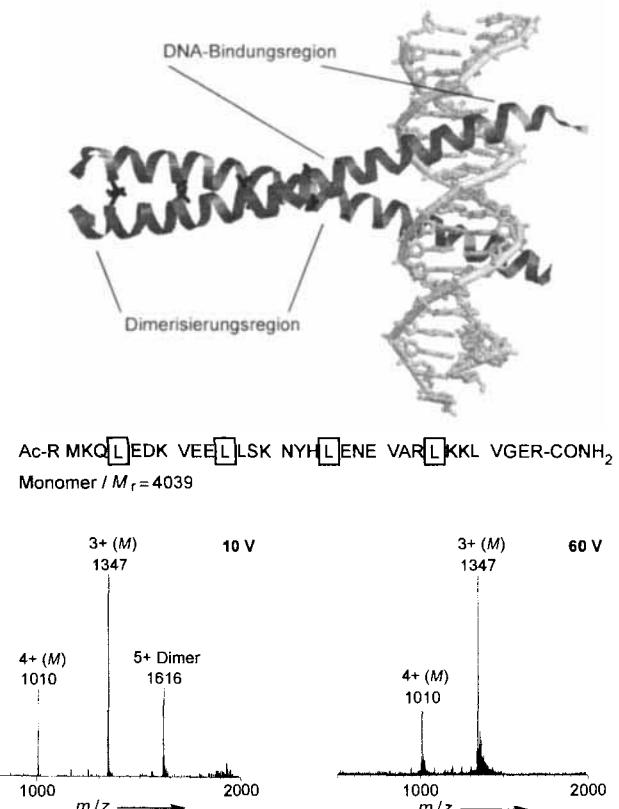


Abb. 13. Unten: ESI-Massenspektren des synthetischen Leucinzipperpeptids GCN4-p1 bei 10 V (links) und 60 V Declustering-Potential (rechts). Das $[M + 5H]^{5+}$ -Ion des Homodimers wird nur bei $\Delta CS = 10$ V nachgewiesen. Injektion von 5 μ L Peptidlösung (50 μ M) in Ammoniumacetat (2 mM): Methanol (9:1). Die oben dargestellte Struktur des GCN4-Leucinzipper-DNA-Komplexes ist der Strukturdatenbank des Brookhaven National Laboratory entnommen (siehe Lit. [46]).

LZ: Ac-E YEALEKK LAA [] EAQ LQALEKK LEALEHG-CONH₂ (L)
LZ12A: Ac-E YEALEKK LAA [] EAQ LQALEKK LEALEHG-CONH₂ (A)

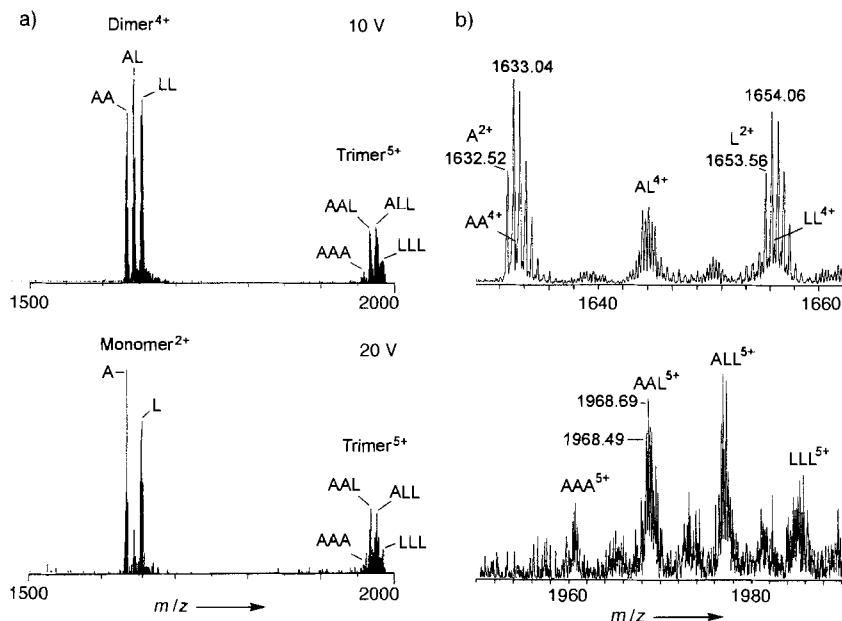


Abb. 14. ESI-massenspektrometrische Identifizierung von Dimeren und Trimeren, die durch Hybridisierung in einem äquimolaren Gemisch (0.1 mM) der Leucinzipperpeptide LZ und LZ12A gebildet wurden [108a]. a) Nachweis der Dimer $^{4+}$ - und Trimer $^{5+}$ -Ionen mit einem Quadrupol-Massenspektrometer bei $\Delta CS = 10$ V (oben) und 20 V (unten). b) Isotopenauflösung der Ionen der Dimere und Monomere (oben) sowie der Trimere (unten) mit einem doppelfokussierenden Sektorfeldmassenspektrometer (Massenauflösung $m/\Delta m \approx 7000$).

des Sedimentationsgleichgewichts bestätigt^[107]. Darüber hinaus gelang in Hybridisierungsversuchen mit sequenzhomologen Polypeptiden erstmals der gleichzeitige Nachweis von Homo- und Heteromeren in Lösung^[107, 108a]. Als Beispiel sind in Abbildung 14 ESI-Massenspektren eines Gemisches aus zwei Sequenzanaloga (LZ und LZ12A, L bzw. A) dargestellt, in denen die Ionen des Hetero-Dimers AL $^{4+}$ sowie beide möglichen Hetero-Trimere ALL $^{5+}$ und AAL $^{5+}$ neben den Ionen der Homomeren auftreten. Dabei ermöglicht die Hochauflösungs-ESI-MS mit einem doppelfokussierenden Sektorfeldmassenspektrometer – im Gegensatz zur ESI-MS mit Quadrupolgeräten – durch Isotopenauflösung eine direkte Zuordnung von dimeren und trimeren Komplex-Ionen anhand ihrer Ladungszahlen^[108a]. So liefern die Massenabstände der Isotopenmultiplets bei m/z 1633 und 1654 ($\Delta m = 0.25$ bzw. 0.5) die Identifizierung und Unterscheidung der Homodimere (M_2) $^{4+}$ und der Monomere M^{2+} und die Isotopen der (M_3) $^{5+}$ -Ionen ($\Delta m = 0.2$) eine direkte Charakterisierung der Trimere. Unter entsprechenden Bedingungen konnten Hetero-Di- und -Trimere der Hybridisierung von GCN4-Polypeptiden mit Coil-Ser-Leucinzippersequenzen identifiziert werden^[107], was mit den Ergebnissen spektroskopischer Untersuchungen der Komplexe fluoreszenzmarkierter Polypeptide^[110] in Einklang ist.

Auch die kürzliche Identifizierung von Dimeren weiterer DNA- und RNA-bindender Proteine wie des RNA-bindenden Autoantigens L7^[100] sowie des Kernmatrixproteins SAF-A^[111] bestätigen das analytische Potential der ESI-MS. Ein weiteres Anwendungsbeispiel ist die Aufklärung der Struktur des Lipidähnlichen SP-C-Proteins aus Lungensurfactant, das wesentliche biochemische Funktionen als Bestandteil der Lungen-Alveolaroberfläche hat^[112–114] und in rekombinanter Form zur Therapie von akutem Lungenvorfall (Respiratory-distress-Syndrom^[115]) entwickelt wurde.

Das SP-C-Protein, das durch eine extrem hydrophobe α -helicale Domäne (ohne Leucinzippermotiv) und eine zweifach palmitoylierte N-terminale Sequenz charakterisiert ist^[116, 117], wurde durch ESI-MS als spezifischer Dimerkomplex identifiziert^[113]; dieses Ergebnis lieferte einen wesentlichen Beitrag zur Formulierung eines Strukturmodells für die Integration und Stabilisierung des palmitoylierten Proteins in der monomolekularen Lipid-Oberflächenschicht des Alveolarsystems^[113, 115]. Bei den bisherigen Anwendungen erweist sich die bei den Leucinzipperproteinen erwähnte Tendenz zur Adsorption an polare Kapillaroberflächen noch als ein experimentelles Hauptproblem, insbesondere bei der Charakterisierung von Proteinkomplexen mit stark hydrophoben Wechselwirkungen^[24]. Erhöhte Stabilitäten von Komplex-Ionen und eine verbesserte Charakterisierung von pH- und konzentrationsabhängigen Gleichgewichten konnten mit Polyacrylamid-beschichteten Kapillaren erzielt werden^[118], die zu einer befriedigenden Übereinstimmung zwischen der Ionenintensität und der Stabilität von Coiled-coil-Polypeptid-

komplexen führten^[107, 108a]. Ein generelles Problem ist dagegen die in Abschnitt 3.1 diskutierte Verringerung der Ionenladungszahlen von Proteinkomplexen relativ zu denen der Komplexbestandteile. So zeigen die Spektren der dimeren und trimeren Leucinzipperkomplexe in Abbildung 13 und 14 jeweils maximale Ladungszahlen von 5+, während die Summe der Ladungszahlen der Monomere 8+ bzw. 12+ beträgt. Dieser Effekt macht sich besonders stark bei Protein-Nucleotid-Komplexen bemerkbar (siehe Abschnitt 3.3) und erfordert bei höhermolekularen Proteinen zunehmend Massenanalysatoren für hohe Massenbereiche (Sektorfeld- oder Flugzeitmassenspektrometer)^[119].

Trotz dieser Einschränkungen konnten erste ESI-Massenpektren von höhermolekularen Proteinen mit intakter Quartärstruktur erhalten werden. Die bisherigen Untersuchungen wurden allerdings ausschließlich an Proteinen mit bekannter spezifischer Assoziation der Untereinheiten in Lösung durchgeführt, z.B. an dimerem Hämoglobin und an den tetrameren Komplexen von Avidin und Streptavidin, die besonders stabile Quartärstrukturen bilden. Ein anschauliches Beispiel ist die Charakterisierung des Lectins Concanavalin A (Con A) mit einem Hochmassen-Quadrupolanalysator^[23] (Abb. 15, M_r (Untereinheit M) = 25500). Bei Bedingungen für eine stabile Quartärstruktur (pH 6.7)^[120] konnten die Ionen des Dimers und des Tetramers mit Ladungszahlen zwischen 14+ und 22+ nachgewiesen werden (m/z -Bereich ca. 4500). Bei höherer Temperatur oder in saurer Lösung treten ausschließlich die Ionen des Monomers im Bereich $m/z < 2000$ auf (Ladungszahlen bis ca. 18+). Ausschlaggebend für den Nachweis der Quartärstruktur ist neben der Temperatur- und pH-Abhängigkeit der Spektren die Abwesenheit von Ionen unspezifischer Assoziate (z.B. Trimere). Wie erwartet, ist die relative Verringerung der Ladungszahlen der Komplex-Ionen beim Tetramer am stärksten, während das denaturierte Monomer hochgeladene Ionen liefert. Zur Bestimmung von Ionenladungszahlen in unterschiedlichen m/z -Bereichen bei Quartärstrukturen aus mehreren Untereinheiten erweisen sich Flugzeitmassenspektrometer als gut geeignet^[1121].

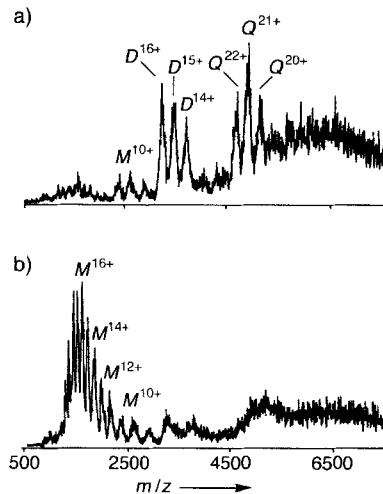


Abb. 15. Identifizierung der dimeren und tetrameren Komplexe von Con A mit einem Quadrupol-Massenspektrometer mit Hochmassenbereich. a) ESI-Massenpektrum von natürlichem Con A in 10 mM Ammoniumacetat (pH 6.7). Die mit Q und D bezeichneten Peaks entsprechen den Ionenserien des Tetramers bzw. Dimers. b) Spektrum der monomeren Untereinheit M nach Denaturierung von Con A bei hoher Ionenquellentemperatur (185 °C) (aus Lit. [23]).

3.3. Charakterisierung von Doppelstrang-Oligonucleotiden und Nucleotidkomplexen höherer Ordnung

Aufgrund der in Abschnitt 2.1 beschriebenen Probleme, einheitliche Molekülanionen in Gegenwart von Alkalimetallsalzen zu erhalten, wurden die meisten bisherigen Untersuchungen von Oligo- und Polynukleotiden mit Ammoniumsalzen durchgeführt^[45, 49, 122] (vgl. Abb. 2 b). Dasselbe gilt für die Charakterisierung von supramolekularen Komplexen (siehe jedoch Abb. 18). Unter diesen Bedingungen zeigen Negativionen-ESI-Massenpektren von DNA- und RNA-Sequenzen keine deutliche pH-Abhängigkeit der $[M - nH]^{n-}$ -Ionenserien (pH-Bereich ca. 4–8)^[24, 122a, 123]. Anders als bei Proteinen konnte eine eindeutige Beziehung zwischen Ladungszahlen und -verteilungen von Polyanionen und dem Strukturzustand in Lösung bisher nicht ermittelt werden, da die Ionenintensitäten offensichtlich auch durch Anteile organischer Lösungsmittel und durch die Basenzusammensetzung beeinflusst werden^[123]. Ein deutlicher Ladungeffekt (relative Verringerung der negativen Ionenladungen) ergibt sich jedoch bei Doppelstrangkomplexen im Vergleich zu den komplementären Einzelstrangsequenzen (siehe Abb. 17). Wie in Abbildung 16 am Beispiel eines A/T-Duplex dargestellt, sind für den Nachweis von Doppelstrangkomplexen aus Einzelsträngen gleicher Basenzusammensetzung – analog wie bei Proteinkomplexen – die ungeraden Ladungszahlen der

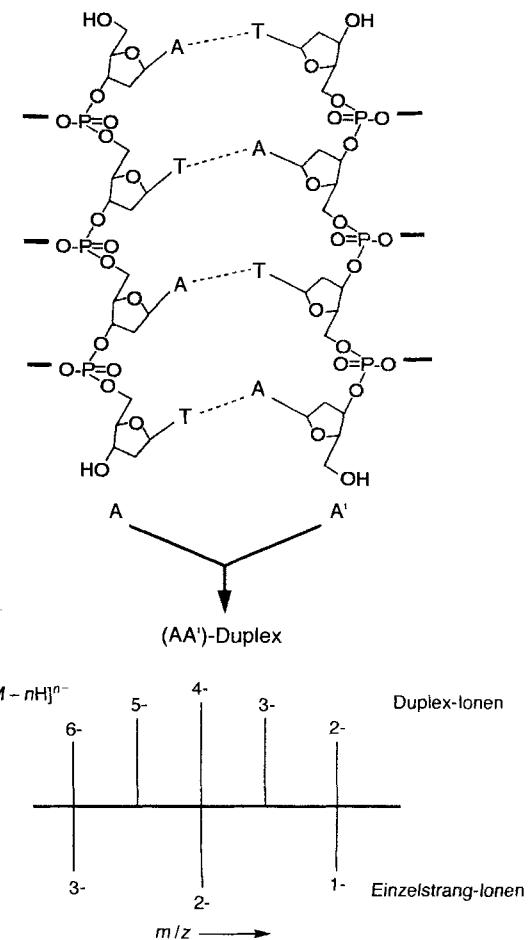


Abb. 16. Schema der Identifizierung von Doppelstrang-Oligonukleotiden aus isobaren Einzelstrangsequenzen anhand der ungeradzahlig geladenen Polyanionen $[M - nH]^{n-}$ des Duplex (vgl. Abb. 12).

Polyanionen des Duplex maßgeblich, während die Zuordnung geradzahliger geladener Komplex-Ionen eine vollständige Isotopenauflösung erfordert.

Erste erfolgreiche Untersuchungen von Doppelstrangkomplexen synthetischer Oligonucleotide wurden nahezu gleichzeitig von mehreren Arbeitsgruppen mit konventionellen Quadrupol-Massenspektrometern durchgeführt^[45, 122a, 124]. Dabei konnten Duplex-spezifische Ionen sowohl für selbstkomplementäre oder isobare Einzelstränge als auch für Sequenzen unterschiedlicher Basenzusammensetzung (Molekulargewichte) nachgewiesen werden (Tabelle 4). ESI-Massenspektren des

Tabelle 4. Identifizierung von Doppelstrang-Oligodesoxynucleotiden durch Negativionen-ESI-Massenspektrometrie.

Oligonucleotide [a]	M_r [b]	Einzelstränge	Duplex	m/z	Duplex-Ionen [c]	Lit.
					Ladungs- zustand [d]	
dC ₄ G ₄	2411	2411	4822	1607	3	4824 [124 b]
d(T) ₈ /d(A) ₈	2371	2443	4814	1624	3	4872 [124 b]
d(T) ₁₀ /d(A) ₁₀	2980	3070	6050	1209	5	6052 [45 a]
d(20mer)I/II	5827	6410	12237	2446 [f]	5	12297 [124 a]
GCN4-L/-U	7360	7347	14707	1638	9	14714 [24, 45 a]
GCN4II-low/+up	11898/12073	23971	1843	11	23997 [45 a]	

[a] Oligonucleotid-Sequenzen: dC₄G₄ = selbstkomplementäres 5'-dCCCCGGGG-3'; d(20mer)I/II = 5'-dCCTTCCTCCCTCTCTCCTCC-3'; 3'-GGAAGGAGGGAGAGAGGAGG-5'; GCN4-L/-U = 5'-dCGCAGCGATGACTCATTTTCGGG-3'/dGCGTCGCCTACTGAGTAAAAAGCC-5'; GCN4II-low/+up = 5'-dAATTCCACCTAGGGATGACTTACTTTCTTAGCGA-3'/5'-dAGCTTCGCTAAGAAAAAAAGTAAGTCATCCGCTAGGTGG-3'. Die Oligonucleotidsequenzen wurden am DNA-Synthesizer mit der Phosphoramiditmethode hergestellt [45, 47]. [b] Molekulargewicht für jeweils nur ein Isotop pro Element ohne Gegenionen. [c] [$M - nH$]⁻-Ionen des Duplex. [d] Ladungszustand des Ions zum Peak höchster Intensität innerhalb eines Massenbereichs bis m/z 2000. [e] Durchschnittliches Molekulargewicht aus den Signalen von Duplex-Ionen unterschiedlicher Ladungszahlen. [f] Nachweis der Duplex-Ionen durch Quadrupolanalysator mit erweitertem Massenbereich.

Hybridisierungsprodukts zweier Erkennungssequenzen des GCN4-Leucinzipper (GCN4-L/-U^[125]) mit einem zentralen Pseudopalindrom als optimaler Bindungsregion sind in Abbildung 17 dargestellt. Von den acht- bis zehnfach geladenen Molekulanionen liefert das [$M - 9H$]⁹⁻-Ion den spezifischen Nachweis des Doppelstrangs ($M_r = 14707$, Abb. 17a), während die geraden Ladungszahlen wegen der geringen Molekulargewichtsdifferenz der Einzelstrangsequenzen keine direkte Unterscheidung ermöglichen ($M_r = 7360$ bzw. 7347, $\Delta m = 13$; siehe Tabelle 4); die quantitative Bildung des Duplex wurde durch Gelelektrophorese bestätigt^[45, 126]. Vergleichende Untersuchungen der Einzelstrangnucleotide sowie weitere Modellstudien zeigten, daß sich Duplex- und Einzelstrang-Ionen auch in Gemischen identifizieren lassen^[24, 122b]. So treten nach partieller Dissoziation neben den Duplex-Ionen (9-, 11-) von GCN4-L/-U die [$M - nH$]ⁿ⁻-Ionen der Einzelstrangsequenzen mit erheblich höheren relativen Ladungszahlen auf (Abb. 17b, siehe auch Abb. 2b). Die direkte Analyse von Einzelstrang/Duplex-Gemischen ermöglicht prinzipiell eine ESI-massenspektrometrische Bestimmung von Duplex-Schmelztemperaturen; erste Untersuchungen dazu wurden durchgeführt^[127]. Für den GCN4-L/-U-Duplex wurde mit einem temperaturgesteuerten Einlaßsystem eine Schmelztemperatur von 59 °C abgeschätzt (UV-spektroskopisch bestimmtes $T_m = 64$ °C)^[45a]. ESI-massenspektrometrische Untersuchungen mehrerer Doppelstrang-

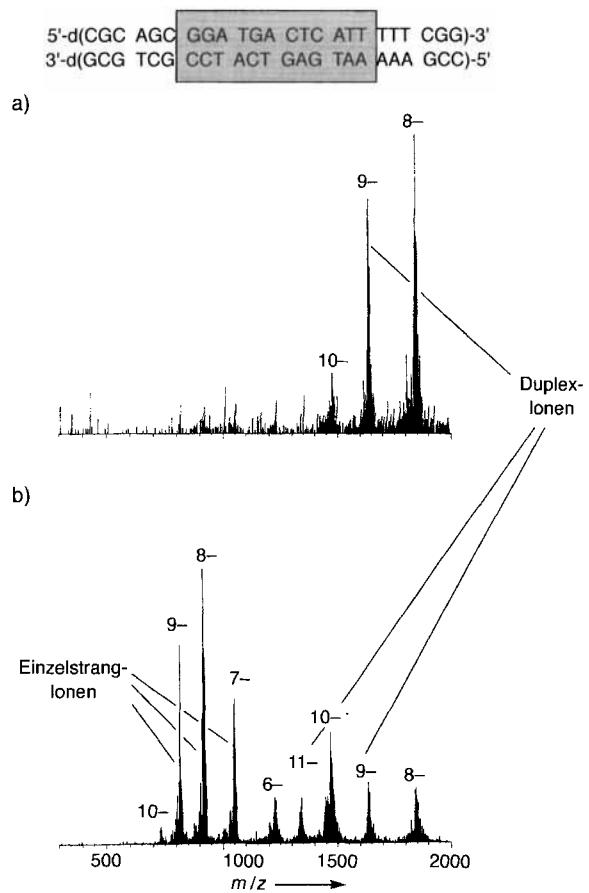


Abb. 17. Identifizierung eines 24meren Doppelstrang-Desoxyribonucleotids. Die synthetischen Einzelstrangsequenzen (GCN4-L/-U) wurden als Polyammoniumsalze gereinigt, und der Duplex wurde in 1 M Ammoniumacetat durch Erhitzen auf 80 °C und langsames Abkühlen auf Raumtemperatur hergestellt; zur ESI-MS wurde in 10 mM Ammoniumacetat umgepuffert [45]. a) Negativionspektrum in Ammoniumacetat/NH₃/Acetonitril 1:1 (pH 9); b) Spektrum des partiell dissozierten Produkts nach Einengen zur Trockne und Lösen in 1 mM Ammoniumacetat. Das zentrale Pseudopalindrom-Segment in der Sequenz des Duplex (oben) ist eingeklammert (siehe Lit. [24]).

Oligonucleotide sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Die aus den ungeradzahligen geladenen Ionen ermittelten Duplex-Molekulargewichte sind meist höher als die aus den Einzelstrangsequenzen berechneten (ohne Gegenionen), da der Nachweis von homogenen [$M - nH$]ⁿ⁻-Ionen entscheidend vom Reinheitsgrad der Ammoniumsalze abhängt (vgl. Abschnitt 2.1). Wie erwartet, zeigen alle bisher untersuchten Doppelstrangnucleotide eine deutliche Verringerung der Ionladungszahlen gegenüber der Summe aus den Ladungszahlen der Einzelstrangsequenzen. So wurde bei einem 20meren Hybridisierungsprodukt ($M_r = 12200$ ^[124a]) das Duplex-Ion höchster Intensität bei m/z 2446 gefunden (siehe Tabelle 4). Die im Massenbereich bis m/z 2000 nachgewiesenen Ionen höhermolekularer Doppelstrangkomplexe spiegeln daher wahrscheinlich nur den Anteil hoher Ladungszahlen wider. Darüber hinaus kann für Duplex-Ionen mit niedrigen Ladungszahlen eine höhere relative Stabilität (oder eine Stabilisierung durch Gegenionen) angenommen werden^[122, 124].

Die bisher an Doppelstrang-Oligonucleotiden erhaltenen Ergebnisse sind angesichts der noch geringen Kenntnisse über Ionenzusammensetzungen und Ladungsstrukturen in den ESI-

Massenspektren von Oligo- und Polynukleotiden vielversprechend. Sie lassen eine Reihe von Anwendungen zur Charakterisierung von supramolekularen Polynukleotidstrukturen erwarten, für die bisher keine (oder nur unzureichende) molekulär spezifische Methoden vorliegen. Beispiele hierfür sind, neben der Nukleotidsequenzierung durch Hybridisierung (anstelle von massenspektrometrischen Sequenzbestimmungen durch Einzelstrangfragmentierung^[128]), die Analyse der Duplexbildung aus chemisch modifizierten Oligonukleotiden ohne Verwendung radioaktiver Markierung^[129] sowie von Antisense-Oligonukleotiden^[130] und Interkalationskomplexen; über die Charakterisierung von Oligonukleotidkomplexen mit Actinomycin D und Distamycin wurde bereits berichtet^[131]. Von besonderem Interesse sind Untersuchungen von zu Watson-Crick-Doppelstrangnukleotiden alternativen Strukturen wie Komplexen mit Hoogsteen-Basenpaarung und nukleotidspezifischen Triplexstrukturen^[132, 133]. Daß Nukleotidkomplexe höherer Ordnung der ESI-MS zugänglich sind, konnte erstmals von Goodlett et al. an einem Quadruplex des guaninreichen Oligonukleotids d(CGCG₃GCG) (dG4) gezeigt werden^[134], in dem die zentralen Guaninbasen in einer „Quartett“paarung alternativ zur intramolekularen Watson-Crick-Basenpaarung vorliegen^[135, 136]. Zur Stabilisierung der Basenpaarung des Komplexes durch Insertion von Alkalimetall-Gegenionen^[135] wurden Negativionen-ESI-Massenspektren in Natriumphosphatpuffer und unter besonders milden Desolvatisierungsbedingungen mit SF₆ als Schutzgas^[137] aufgenommen (Abb. 18). Obwohl die Gegenwart des Alkalimetallsalzes zu einer erheblichen Peakverbreiterung führt, gelang der eindeutige Nachweis des Quadruplex anhand der spezifischen ungeradzahlig geladenen Ionen (dG4)₄¹¹⁻ und (dG4)₄⁹⁻.

Die erfolgreiche Charakterisierung supramolekularer Komplexe von Proteinen und Oligonukleotiden liefert prinzipiell die Voraussetzung für die direkte Analyse von Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen. Bei Proteinkomplexen mit Mono- und Dinukleotiden oder analogen Cofaktoren sind im wesentlichen die Bedingungen der Positivionen-ESI-MS von Proteinen anwendbar^[89, 93] (vgl. Tabelle 3). In Untersuchungen der Nucleo-

tidbindungsregion des Elongationsfaktors EF-Tu aus *T. thermophilus*^[138] konnten die GDP- und GTP-gebundenen Proteinkomplexe anhand homogener [M + nH]ⁿ⁺-Ionenserien nachgewiesen werden; ihr Vorliegen wurde durch proteinchemische und spektroskopische Ergebnisse bestätigt^[139]. Unter entsprechenden Bedingungen waren bei Komplexen mit höhermolekularen DNA- und RNA-Sequenzen (Leucinzipperproteine, EF-Tu/tRNA-Komplex^[138]) keine hochgeladenen Komplex-Ionen nachweisbar^[108a]. Die Analyse von intakten Protein-Nukleinsäure-Komplexen scheint wegen der vielfachen ionicen Wechselwirkungen und der Neutralisation durch Gegenionen weitgehend auf hochmolekulare (niedrig geladene) Ionen begrenzt zu sein; künftige Anwendungen werden daher wesentlich von der weiteren Entwicklung von ESI-Hochmassenanalytoren abhängen.

4. ESI-massenspektrometrische Charakterisierung von synthetischen supramolekularen Komplexen

Die Synthese von supramolekularen Komplexen aus synthetischen, selbstorganisierenden Komponenten und die Charakterisierung ihrer Strukturen und Funktionen haben sich in den letzten 8–10 Jahren zu einem hochaktuellen Forschungsgebiet entwickelt^[140–143]. Inzwischen wurde ein breites Spektrum an supramolekularen Strukturen wie synthetischen Helicaten, Catenanen^[144] und Wirt-Gast-Komplexen^[145] als Modellsysteme für natürliche Selbsterkennungsprozesse^[146] sowie an Komplexen mit neuen Struktur-Eigenschafts-Beziehungen entwickelt^[147]. Die Isolierung und Reinigung von homogenen supramolekularen Komplexen bereitet oft besondere Schwierigkeiten, so daß nur in wenigen Fällen die vollständige Charakterisierung mit spektroskopischen Methoden oder durch Kristallstrukturanalyse gelang^[141]. Als ein Hauptproblem erwies sich vielfach die analytische Charakterisierung des Reaktionsverlaufs bei der Bildung spezifischer Komplexe aus Mehrkomponentengemischen^[148]; hierzu wurden in letzter Zeit zunehmend massenspektrometrische Methoden eingesetzt^[148, 149].

Beispiele von ESI-Massenspektren supramolekularer Komplexe aus Rotaxan-, Catenan- und Helicat-bildenden Komponenten sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Für nahezu alle bisher untersuchten Komplexe wurden stabile Elektrospraybedingungen gefunden und hohe Ionenintensitäten in organischen (aprotischen) Lösungsmitteln erzielt. Die Ladungszahlen der Komplex-Ionen lassen sich meist in einfacher Weise anhand der vorhandenen Metallionen^[153, 154] oder des (formalen) Verlusts eines oder mehrerer Gegenionen zuordnen^[149]. So wurden bei Catenankomplexen aus 4,4'-Bipyridylderivaten und makrocyclischen oder aromatischen Polyetherliganden Molekülionen mit bis zu vier PF₆⁻-Gegenionen weniger nachgewiesen^[149]; die entsprechende Serie vielfach geladener Ionen ermöglicht die Identifizierung von dimeren Komplexen in analoger Weise wie die der vielfach protonierten Ionen von Proteinkomplexen (vgl. Abschnitt 3.2). Die in Tabelle 5 angegebenen Catenane und Rotaxane konnten zum Teil auch durch FAB-MS charakterisiert werden^[149, 150] (siehe Abschnitt 5). Vergleichende Untersuchungen von Catenanen zeigen^[155], daß in FAB-Massenspektren überwiegend einfach geladene Ionen auftreten, so

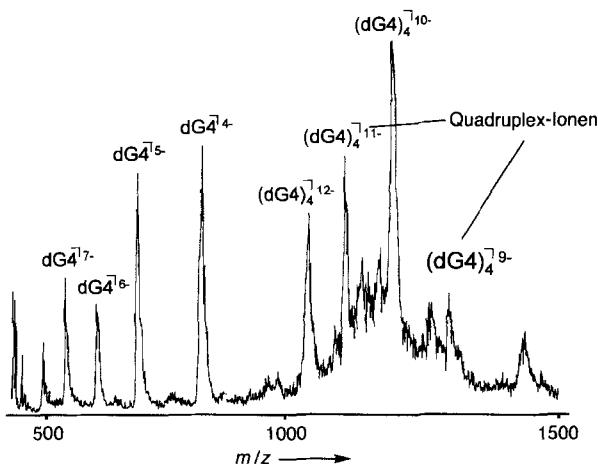


Abb. 18. Identifizierung des Tetramers von 5'-d(CGCGGGGCG)-3' (dG4). Zur Negativionen-ESI-MS wurde eine Lösung von 0.9 mM dG4 in 10 mM Natriumphosphat (pH 7.6) unter Zusatz von 0.1 mM Ethylen diamintetraacetat (EDTA) hergestellt; die Spektrenaufnahme erfolgte mit SF₆ als Schutzgas. Die ungeradzahlig geladenen, Quadruplex-spezifischen Ionen sind gekennzeichnet (aus Lit. [134]).

Tabelle 5. ESI-massenspektrometrische Identifizierung von supramolekularen Komplexen aus synthetischen selbstorganisierenden Komponenten.

Komplex-typ	Komplexkomponenten		supramolekularer Komplex	Lit.	
	Ligand	Metall-/Gegenionen [a]	M_r [b]	Assozierung	Ladungszahl [c]
Catenan	4,4'-Bipyridyl; makrocyclischer Polyether	-/ PF_6^-	2525	Dimer	3+
Rotaxan	Bisporphyrin)-phenanthrolin (Spacer); makrocyclischer Polyether	$\text{Cu}^{\text{I}}/\text{PF}_6^-$ $\text{Au}^{\text{III}}/\text{PF}_6^-$	2986	1:1-Addukt	2+
Helicat	Oligo(2,2'-bipyridyl)etherderivat	$\text{Cu}^{\text{I}}/\text{ClO}_4^-$ $\text{Ni}^{\text{II}}/\text{ClO}_4^-$	1659 2419	Doppelhelicat Tripelhelicat	3+ 6+
Catenan	Phenanthrolin; (cyclo)-Oligo-acetylenderivat	$\text{Cu}^{\text{I}}/\text{BF}_4^-$	4444 5557 6668	Pentacatenan Hexacatenan Heptacatenan	4+ 5+ 6+

[a] Zur Synthese der Komplexe verwendete Metall- und Gegenionen. [b] Molekulargewichte der ungeladenen Komplexe (einschließlich Gegenionen). [c] Ladungszahl des Komplex-Ions, das den Peak höchster Intensität liefert.

dass die ESI-MS vor allem bei höhermolekularen Komplexen ($>$ ca. 3000 Da) von Vorteil ist. So konnten Bitsch et al. multicyclische Komplexe mit bis zu sieben Catenanringen und Molekulargewichten $>$ 7000 Da nachweisen^[152].

Darüber hinaus erwies sich die ESI-MS als effiziente Methode zur direkten Analyse von Gemischen aus selbstorganisierenden Komponenten. So konnte die Bildung von doppelsträngigen Cu^{I} -Komplexen mit Oligo(2,2'-bipyridyl)etherderivaten nachgewiesen werden, während mit Ni^{II} -Ionen die selektive Bildung von entsprechenden Tripelhelicaten durch ESI-MS belegt wurde^[151]. Ein anschauliches Beispiel ist der ESI-massenspektrometrische Nachweis der Komplexbildung zwischen einem Bis(isochinolin)-Liganden (L1) und Hexaphenylhexaaazatriphenylen (L2) sowie CuPF_6^- ^[149] (Abb. 19). ESI-Massenspektren eines äquimolaren Gemischs der beiden Liganden nach Titration mit 2.5 Äquivalenten CuPF_6^- belegten anhand des spezifischen $[(\text{L1})(\text{L2})\text{Cu}^{\text{I}}_3]^{3+}$ -Ions (m/z 616) den Dreikomponentenkomplex 1; durch Tandem-ESI-MS wurden die Fragment-Ionen der Komplexkomponenten, $[(\text{L1})\text{Cu}]^{2+}$ (m/z 547) und $[(\text{L2})\text{Cu}]^{+}$ (m/z 753), identifiziert (Abb. 19 unten). Zusätzlich konnten die partiell abgesättigten Komplexe mit einem oder zwei Cu^{I} -Ionen (2 bzw. 3) als Nebenprodukte nachgewiesen werden. Die Ionenintensitäten in den ESI-Massenspektren stimmten gut mit den Ergebnissen aus photometrischen Titrationen^[156] überein. Diese Ergebnisse lassen die Möglichkeit einer direkten ESI-massenspektrometrischen Analyse von supramolekularen Komplexen unter thermodynamischen Gleichgewichtsbedingungen erkennen; inwieweit – wie postuliert^[148, 157] – Komponenten komplexer Reaktionsgemische quantitativ erfassbar sind, muß jedoch in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

5. Vergleich der ESI-Massenspektrometrie mit anderen Ionisierungsmethoden

Die erfolgreiche Entwicklung der ESI-MS zur Charakterisierung von supramolekularen Komplexen lässt entsprechende Anwendungen auch für andere Ionisierungsmethoden vermuten. Mit Ausnahme von einigen frühen Arbeiten – z.B. FAB-MS von Polysaccharid-Lipid-Komplexen^[158] – liegen bisher keine systematischen Untersuchungen nichtkovalerter Komplexe von Biopolymeren durch FAB-MS, PD-MS oder MALDI-MS vor. Vergleiche dieser Verfahren mit der ESI-MS an Biopolymeren definierter Struktur in Lösung sind vor allem durch die unterschiedlichen Probenpräparationsverfahren erschwert. Die Analyse homogener Probenlösungen ist nur bei der FAB-MS möglich^[15]; die PD-MS wird meist mit Festproben durchgeführt, und eine Solubilisierung erfordert spezielle Bedingungen (z.B. zur Durchführung und Analyse von chemischen Umsetzungen *in situ*)^[17, 15, 159]. Bei der MALDI-MS wurden bisher fast ausschließlich Festproben in Gegenwart der Matrixsubstanz in hohem Überschuß untersucht^[11, 160, 161]; über den Strukturzustand von Makromolekülen unter diesen Bedingungen ist bisher kaum etwas bekannt.

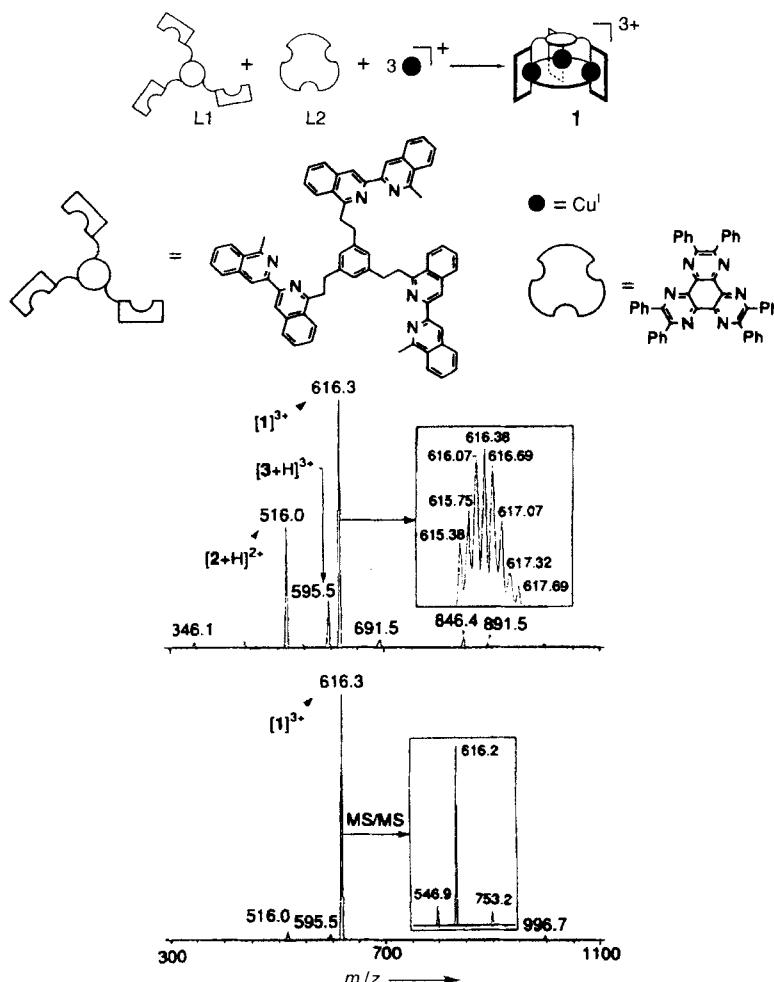


Abb. 19. ESI-Massenspektren des Dreikomponentenkomplexes aus dem Tris(bisisochinolin) L1, Hexaphenylhexaaazatriphenylen L2 und drei Cu^{I} -Ionen. Die Spektren wurden direkt von einer äquimolaren Lösung aus L1 und L2 in Acetonitril:CH₂Cl₂ (1:1) nach Titration mit einem 2.5-fachen Überschuss an CuPF_6^- (oberes Spektrum) und einem 6fachen Überschuss an CuPF_6^- (unteres Spektrum) erhalten. Das Multipletsignal im oberen Spektrum zeigt die Isotopenabstände von 0.3 für das dreifach geladene Molekülion von 1 (aus Lit. [148]).

Eine Reihe von synthetischen supramolekularen Komplexen wie Catenane und Rotaxane konnten durch FAB-MS in organischen Lösungsmitteln nachgewiesen werden (meist mit 3-Nitrobenzylalkohol als Matrix; vgl. Abschnitt 4)^[155, 162, 163]. So zeigen die Positivionen-FAB-Massenspektren von Oligocatenanen makrocyclischer Polyether (vgl. Tabelle 5) Molekülkationen unter Verlust eines PF_6^- -Gegenions sowie Fragmentierung durch Ringöffnung und Abspaltung von Bipyridiniumkomponenten^[162b]. Wesentliche Einschränkungen für die Anwendbarkeit der FAB-MS sind die bereits erwähnte Molekulargewichtsbeschränzung, die Änderung der Probenkonzentration durch Verdampfen der Lösungsmittelmatrix und die Instabilität vieler Koordinationskomplexe in polaren Lösungsmitteln. Erste erfolgreiche Untersuchungen gelangen in wässrigen Lösungen mit Glycerin als Matrix^[97, 163, 164]. So konnten Semirotaxankomplexe von β -Cyclodextrinen (β -CD) in wässriger Glycerinlösung anhand der intensiven $[M + \text{H}]^+$ -Ionen nachgewiesen werden, wie in Abbildung 20 am Beispiel eines 1:1-Komplexes aus β -CD

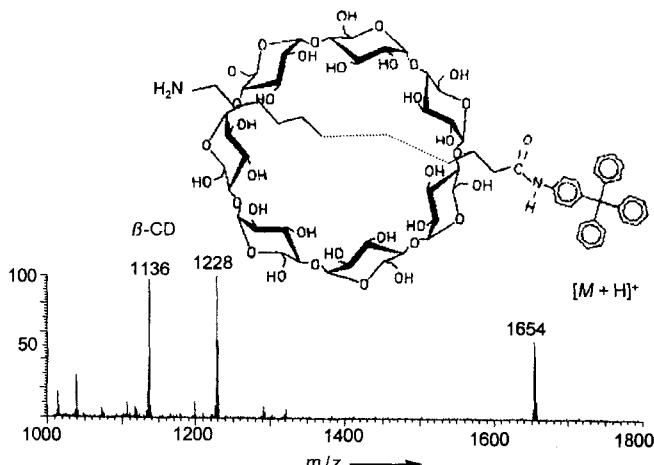


Abb. 20. FAB-Massenspektrum des Semirotaxankomplexes aus β -CD und 11-Aminoundecansäure-4'-(triphenylmethyl)anilid; Lösungsmittel: Methanol:3-Nitrobenzylalkohol (1:1) [163].

und 11-Aminoundecansäure-4'-(triphenylmethyl)anilid dargestellt^[163]; vergleichende Untersuchungen von Semirotaxanen durch ESI-MS zeigten ebenfalls eine bevorzugte Bildung von einfach geladenen Komplex-Ionen^[164]. Für die Analyse von Biopolymerkomplexen durch FAB-MS muß die Probenpräparation unter physiologischen Lösungsmittelbedingungen möglich sein. So wurden in Negativionen-FAB-Massenspektren von Duplex-Oligonucleotiden wie bei PD-massenspektrometrischen Untersuchungen^[45] ausschließlich Molekülionen der Einzelstrangsequenzen sowie zum Teil sequenzspezifische Fragmente nachgewiesen. Der kürzliche Nachweis von Cu^{II} -Komplexen des Oligopeptids Angiotensin^[165, 166] durch PD-MS aus wässriger Lösung unter sorgfältig kontrollierten pH-Bedingungen spricht jedoch dafür, daß Fortschritte in der Analyse nichtkovaler Komplexe durch FAB-MS und PD-MS durch die Weiterentwicklung der Probenpräparation erwartet werden können^[164, 166, 167].

Einer Anwendung der MALDI-MS zur Charakterisierung von supramolekularen Komplexen stehen derzeit als Hauptprobleme die stark denaturierenden Probenpräparationsbedingun-

gen und die Bildung von unspezifischen Clusterionen oder Matrixaddukten entgegen^[161, 168, 169]. Die – generell beobachtete – Bildung unspezifischer Aggregate ist in Abbildung 21 am Beispiel der UV - MALDI - Spektren von Cytochrom C und einem IgG-Antikörper dargestellt^[11]. Beide Spektren zeigen neben den Peaks der einfach und doppelt geladenen Molekülionen der Proteine weniger intensive Peaks für dimere und trimere Assoziate ohne Bezug zu einer Quartärstruktur. Die Proben werden meist in eine stark saure Matrixsubstanz mit geeigneten Absorptionseigenschaften eingebettet (z.B. Benzoe- und Zimtsäurederivate für die UV-MALDI-MS)^[161, 168]. Unter diesen Bedingungen ist generell eine vollständige Denaturierung von Proteinstrukturen und eine Dissoziation spezifischer Wechselwirkungen zu erwarten. Dementsprechend wurden bei ersten Versuchen zur Charakterisierung nichtkovaler Komplexe entweder keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt oder ausschließlich Dissoziationsprodukte nachgewiesen (z.B. bei Hämoproteinen^[169])^[168a, 170]. Eine Reihe von Matrixsubstanzen zur Kristallisation aus wässrigen Lösungen im pH-Bereich von 2–8 wurde für die UV-MALDI-MS entwickelt^[171], jedoch noch nicht an supramolekularen Komplexen getestet. Zur Charakterisierung von nichtkovalen Wechselwirkungen ist die IR-MALDI-MS mit flüssigen Matrixsubstanzen aufgrund ihrer milden Desorptionsbedingungen^[172] möglicherweise aussichtsreicher als die Analyse von (kristallinen) Festsubstanzen; interessant ist in diesem Zusammenhang der Nachweis von vielfach geladenen Ionen in IR-MALDI-Massenspektren, z.B. bei Immunglobulinen^[161]. Zusammenfassend ist festzustellen, daß trotz einzelner Beobachtungen von spezifischen Komplex-Ionen (z.B. beim Ionenkanalprotein Porin^[161]) eine mögliche Eignung der MALDI-MS für die Analyse supramolekularer Komplexe bisher noch ungeklärt ist. Für die weitere Entwicklung sind die Aufklärung von Matrixchemie und Desorptionsmechanismus von entscheidender Bedeutung.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Obwohl erst seit wenigen Jahren zur Molekulargewichts- und Primärstrukturanalyse von Biopolymeren eingeführt, zeichnet sich mit der ESI-MS erstmals eine massenspektrometrische Methode ab, die – über die Primärstrukturbene hinaus – Informationen über Tertiärstrukturzustände in Lösung liefern kann und die Charakterisierung spezifischer nichtkovaler Wechselwirkungen von Makromolekülen ermöglicht. Die bereits erfolgreich durchgeföhrten Anwendungen eröffnen neue Perspektiven für eine direkte Analyse von supramolekularen Komplexen und

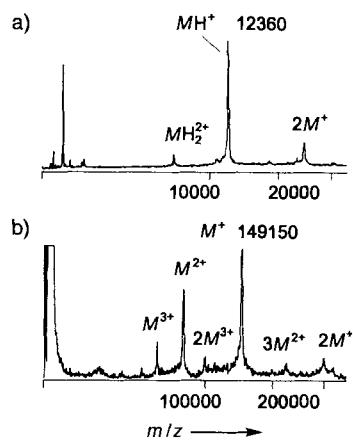


Abb. 21. UV-MALDI-Massenspektren a) von Schweine-Cytochrom C (337 nm; Matrix 2,5-Dihydroxybenzoësäure). b) vom monoklonalen IgG-Antikörper (Maus) gegen Human-Lymphokin (266 nm; Matrix Nicotinsäure) (aus Lit. [11]).

für eine direkte Analyse von supramolekularen Komplexen und molekularen Erkennungsprozessen in Makromolekülen. Darüber hinaus zeigen die bisherigen Arbeiten, daß die ESI-massenspektrometrische Identifizierung von Aufbau, molekularer Zusammensetzung und Bindungsspezifität supramolekularer Komplexe komplementäre Aussagen zur Strukturanalyse mit spektroskopischen und röntgenographischen Methoden liefert^[173–176].

Das bereits gezeigte Anwendungspotential scheint vielversprechend, obwohl für die ESI-MS bisher – wie bei anderen schonenden Ionisierungsmethoden – kaum mehr als qualitative Modellvorstellungen zum Mechanismus von Ionenbildung und -transfer in die Gasphase vorliegen^[23, 50, 177]. Während der Nachweis von elektrostatischen Wechselwirkungen in Makromolekülen prinzipiell zu erwarten war^[10, 177], konnte eine vergleichbare Spezifität auch bei Komplexen mit unterschiedlichen Bindungsarten, z.B. Wasserstoffbrücken- und hydrophoben Wechselwirkungen, nachgewiesen werden. Ferner muß berücksichtigt werden, daß die bisherigen Untersuchungen nahezu ausschließlich an hochgeladenen Ionen und bei niedriger Auflösung durchgeführt wurden; instrumentelle Voraussetzungen zur Charakterisierung von Ionen supramolekularer Komplexe mit niedrigen Ladungszeiten liegen erst seit kurzem vor^[23, 119]. Die jüngst entwickelten ESI-Ionencyclotronresonanz(ICR)-Geräte^[178] dürften besonders zur Identifizierung von Komplex-Ionen in hohen Massenbereichen und bei hoher Auflösung sowie zur Charakterisierung der Gasphasenstruktur von Makro-Ionen geeignet sein. Eine Schlüsselrolle kommt ferner der Weiterentwicklung der Probenzuführungssysteme zur Steuerung der Komplexbildung (pH, Temperatur) in Lösung sowie des ESI-Interface zur Steuerung der Desolvatisierungsbedingungen zu. Trotz der bereits nachgewiesenen Korrelation zwischen Lösungsstrukturen und Ione-ladungsstrukturen befindet sich die Charakterisierung von Makro-Ionen beim Übergang aus der kondensierten Phase noch im Anfangsstadium. Die bisherigen Arbeiten zeigen jedoch, daß vor allem die Kombination von ESI-MS und NMR-Spektroskopie wertvolle Strukturaussagen liefert, zum Beispiel bei H/D-Austauschuntersuchungen^[179].

Analytisches Potential sowie Anwendungsgrenzen der ESI-Massenspektrometrie von supramolekularen Komplexen, insbesondere hinsichtlich der quantitativen Charakterisierung von Komplexbildungsgleichgewichten, sind erst in Umrissen erkennbar. Jedoch zeichnet sich bereits eine Reihe neuer Anwendungsgebiete ab, z.B. der Nachweis einer sequenzspezifischen Oligomerisierung von helicalen Polypeptiden^[180], die Charakterisierung von Antigen-Antikörper-Komplexen^[181, 182], Untersuchungen von Enzym- und Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen, von synthetischen kombinatorischen Peptidgemischen^[183] und von synthetischen supramolekularen Komplexen^[184, 185]. Es ist zu erwarten, daß die für analytische Zwecke weiterentwickelte ESI-MS in einem breiten interdisziplinären Anwendungsbereich Interesse finden wird.

Den an den beschriebenen Untersuchungen beteiligten Mitarbeitern, insbesondere Dr. Detlev Suckau, Dr. Klaus Schneider, Dr. Andrea Schäfer, Dr. Per F. Nielsen, Dr. Michal Svoboda, Dr. Claudia Maier, Dipl.-Ing. Klaus Hägele, Dipl.-Chem. Winfried Fiedler, Dipl.-Chem. Christoph Borchers, Dipl.-Chem. Petra Mayer, Dipl.-Chem. Jürgen Kast, Dr. Kerstin Seidel,

Dipl.-Chem. Rainer Schuhmacher, Dr. Wolfgang Weinmann, Dr. Martin Kussmann, Dipl.-Chem. Ingrid Kaufmann, Dipl.-Chem. Stefan Witte, Dipl.-Chem. Volker Schnaible, Dipl.-Chem. Andreas Wattenberg, Dipl.-Chem. Martina Schuhmacher, Dipl.-Chem. Marcus Macht und Dipl.-Chem. Sebastian Bauer, sind wir für ihr Engagement, ihre Ideen und zahlreiche Diskussionen in großem Dank verbunden. Den Professoren K. P. Schäfer, K. Klemm, A. L. Burlingame, F. W. Röllgen, C. Stürmer, U. Krawinkel, G. Spiteller, M. Sprinzl, P. Roepstorff und W. Welte danken wir für hilfreiche Diskussionen, Kritik und Anregungen, insbesondere hinsichtlich neuer Anwendungsgebiete. Ebenso danken wir den Kollegen A. Van Dorsselaer, K. Tomer, M. L. Deinzer, G. Jung, F. W. McLafferty, M. Mak und R. Frank für die Übersendung von Manuskripten und die Mitteilung zahlreicher unveröffentlichter Ergebnisse. M. P. dankt dem Land Baden-Württemberg für Unterstützung und vor allem Herrn Professor B. Penke für Gastfreundschaft und hilfreiche Diskussionen während eines Gastaufenthalts an der A.-Szent-György-Universität Szeged (Ungarn). Für großzügige finanzielle Unterstützung danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Bundesministerium für Forschung und Technologie, dem Fonds der Chemischen Industrie und der Europäischen Gemeinschaft (EU – Network „Peptide and Protein Structure Analysis by Mass Spectrometry“).

Eingegangen am 9. April 1994,
veränderte Fassung am 19. Oktober 1995 [A 62]

- [1] *Biological Mass Spectrometry* (Hrsg.: A. L. Burlingame, J. A. McCloskey), Elsevier, Amsterdam, 1990.
- [2] K. Biemann, S. A. Martin, *Mass Spectrom. Rev.* **1987**, *6*, 1.
- [3] A. L. Burlingame, T. A. Baillie, D. H. Russel, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 467.
- [4] H. D. Beckey, *Principles of Field-Ionization and Field Desorption Mass Spectrometry*, Pergamon, Oxford, 1977.
- [5] a) M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, 325; b) W. Aberth, K. M. Straub, A. L. Burlingame, *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 2029; c) M. Przybylski, *Z. Anal. Chem.* **1983**, *315*, 402; d) Liquid-secondary ion mass spectrometry (LSIMS) wird in der Literatur als Synonym für FAB-MS verwendet.
- [6] a) B. Sundquist, R. D. Macfarlane, *Mass Spectrom. Rev.* **1985**, *4*, 421; b) R. J. Cotter, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 781.
- [7] G. P. Jonsson, A. B. Hedin, P. L. Hakanson, B. U. R. Sundquist, B. G. S. Save, P. F. Nielsen, P. Roepstorff, K. E. Johansson, I. Kamensky, M. S. L. Lindberg, *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 10843.
- [8] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **1989**, *246*, 46.
- [9] a) M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299; b) F. Hillenkamp, M. Karas, A. Ingendoh, B. Stahl in *Biological Mass Spectrometry* (Hrsg.: A. L. Burlingame, J. A. McCloskey), Elsevier, Amsterdam, 1990, S. 49.
- [10] R. D. Smith, J. A. Loo, R. R. Orgorzalek-Loo, M. Busman, H. R. Udseth, *Mass Spectrom. Rev.* **1991**, *10*, 359.
- [11] M. Karas, U. Bahr, U. Gießmann, *Mass Spectrom. Rev.* **1991**, *19*, 335.
- [12] Zur Vereinfachung werden im folgenden Ionen, die auf einem intakten – z. B. einem protonierten – Makromolekül beruhen, generell als Molekülien bezeichnet.
- [13] K. Biemann in *Protein Sequencing - A Practical Approach* (Hrsg.: J. B. C. Findley, M. J. Geisow), IRL, Oxford, 1989, S. 99.
- [14] a) P. Roepstorff, P. F. Nielsen, K. Klarskov, P. Hørjup, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1988**, *16*, 9; b) P. F. Nielsen, B. Landis, M. Svoboda, K. Schneider, M. Przybylski, *Anal. Biochem.* **1990**, *191*, 302; c) K. Biemann, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1988**, *16*, 99; d) B. T. Chait, F. H. Field, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *134*, 420.
- [15] a) P. F. Nielsen, K. Schneider, D. Suckau, B. Landis, M. Przybylski in *Mass Spectrometry of Large Non-Volatile Molecules* (Hrsg.: E. Hilf, A. Tuczynski), World Sci., Singapur, 1990, S. 194; b) C. Fenselau, *Adv. Mass Spectrom.* **1995**, *13*, 129.
- [16] a) J. T. Stults, W. J. Henzel, J. H. Bourell, P. R. Griffin in Lit. [1], S. 599; b) M. Svoboda, M. Przybylski, J. Schreurs, A. Miyajima, K. Hogeland, M. Deinzer, *J. Chromatogr.* **1991**, *562*, 403; c) M. O. Glocker, B. Arbogast, J. Schreurs, M. L. Deinzer, *Biochemistry* **1993**, *32*, 482.
- [17] a) D. Suckau, J. Köhl, G. Karwarth, K. Schneider, M. Casaretto, D. Bitter-Suermann, M. Przybylski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 9848; b) D. Suckau, Dissertation, Universität Konstanz, 1991; c) M. Przybylski, W. Fiedler, M. Macht, M. O. Glocker, *Mass Spectrom. Rev.* **1996**, im Druck.

- [18] C. Gauss, J. Klein, K. Post, D. Suckau, K. Schneider, H. Thomas, F. Oesch, M. Przybylski, *Environ. Health Perspect.* **1990**, *88*, 57.
- [19] H. R. Morris, F. M. Grier, *Trends Biotechnol.* **1988**, *6*, 140.
- [20] Der Begriff "supramolekularer Komplex" wird im folgenden zur allgemeinen Kennzeichnung von nichtkovalenten Komplexen, die durch spezifische Assoziation von Makromolekülen oder niedermolekularen Komponenten entstehen, verwendet.
- [21] M. Przybylski, I. Manz, P. Fonrobert, I. Dietrich, H. Brückner, *Adv. Mass Spectrom. B* **1986**, *10*, 1519.
- [22] K. Schneider, Dissertation, Universität Konstanz **1991**.
- [23] R. D. Smith, K. J. Light-Wahl, *Biol. Mass Spectrom.* **1993**, *22*, 493.
- [24] M. Przybylski, *Adv. Mass Spectrom.* **1995**, *13*, 257.
- [25] R. Feng, Y. Konishi, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 638.
- [26] Die Intensitätsverteilung innerhalb einer homogenen Serie vielfach geladener Ionen eines Makromoleküls mit definiertem Strukturzustand in Lösung wird von uns zusammenfassend als Ladungsstruktur bezeichnet.
- [27] a) L. J. Smith, M. J. Sutcliffe, C. Refield, C. M. Dobson, *Biochemistry* **1991**, *30*, 986; b) H. Rode, *Methods Enzymol.* **1989**, *176*, 446.
- [28] F. Vögtle, *Supramolekulare Chemie*, Teubner, Stuttgart, **1992**.
- [29] a) M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice, *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2240; b) G. A. Clegg, M. Dole, *Biopolymers* **1971**, *10*, 821.
- [30] A. P. Bruins, T. R. Covey, J. D. Henion, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2642.
- [31] J. V. Iribarne, B. A. Thompson, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2287.
- [32] T. R. Covey, R. F. Bonner, B. I. Sushan, J. D. Henion, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 249.
- [33] M. H. Allen, M. L. Vestal, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1992**, *3*, 18.
- [34] M. Mann, *Org. Mass Spectrom.* **1990**, *25*, 575.
- [35] R. D. Smith, H. R. Udseth, C. J. Barinaga, C. G. Edmonds, *J. Chromatogr.* **1991**, *559*, 197.
- [36] R. D. Smith, C. J. Barinaga, H. R. Udseth, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1948.
- [37] W. Fiedler, M. Macht, M. O. Glocker, I. Kaufmann, M. Przybylski, *Protein Sci.* **1995**, *4*, Suppl. 1, 122.
- [38] R. D. Smith, J. A. Loo, C. G. Edmonds, C. J. Barinaga, H. R. Udseth, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 882.
- [39] a) M. Mann, C. K. Meng, J. B. Fenn, *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 1702; b) M. H. Allen, T. W. Hutchens, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, *6*, 308.
- [40] C. Michinson, R. L. Baldwin, *Proteins* **1986**, *1*, 23.
- [41] I. Kato, C. B. Anfinson, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 1004.
- [42] J. A. Loo, C. G. Edmonds, R. D. Smith, M. P. Lacey, T. Keough, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1990**, *19*, 286.
- [43] R. R. Ogorzalek-Loo, D. R. Goodlett, R. D. Smith, J. A. Loo, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4391.
- [44] A. A. Schreier, R. L. Baldwin, *Biochemistry* **1977**, *16*, 4203.
- [45] a) J. Kast, Diplomarbeit, Universität Konstanz, **1993**; b) J. Kast, M. Przybylski, E. Dürr, H. Wendt, H. R. Bosshard, *Protein Sci.* **1995**, *4*, 105.
- [46] T. E. Ellenberger, C. J. Brandle, K. Struhl, S. C. Harrison, *Cell* **1992**, *71*, 1223.
- [47] J. W. Escavitch, L. J. McBride, J. S. Eadi, in *Biophosphates and Their Analogs/Synthesis, Structure, Metabolism and Activity* (Hrsg.: K. S. Bruzik, W. J. Stoc), Elsevier, Amsterdam, **1990**, S. 205.
- [48] B. A. Connolly, B. V. L. Potter, F. Eckstein, A. Pingoud, L. Grotjahn, *Biochemistry* **1984**, *23*, 3443.
- [49] J. T. Stults, J. C. Marsters, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 359.
- [50] J. B. Fenn, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 524.
- [51] a) U. Lüttgens, F. W. Röllgen, *Proc. 39th Conf. Am. Soc. Mass Spectrom. Allied Topics* **1991**, *439*; b) G. Schmelzeisen-Redeker, L. Bütscher, F. W. Röllgen, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1989**, *90*, 139; c) F. W. Röllgen, U. Lüttgens, T. Dülciks, U. Giessmann, *Proc. 41st Conf. Am. Soc. Mass Spectrom. Allied Topics* **1993**, 1.
- [52] S. F. Wong, C. K. Meng, J. Fenn, *J. Phys. Chem.* **1988**, *10*, 368.
- [53] A. L. Rockwood, M. Busman, R. D. Smith, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1991**, *111*, 103.
- [54] B. E. Winger, K. J. Light-Wahl, R. D. Smith, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1992**, *3*, 624.
- [55] R. Guevremont, J. C. Y. Le Blanc, K. M. W. Siu, *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *28*, 1345.
- [56] a) S. K. Chowdhury, V. Katta, B. T. Chait, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9012; b) K. W. M. Siu, R. Guevremont, J. C. Y. Le Blanc, R. T. O'Brien, S. S. Berman, *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *29*, 570; c) R. Guevremont, K. W. M. Siu, J. C. Y. Le Blanc, S. S. Berman, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1992**, *3*, 216.
- [57] J. A. Loo, C. G. Edmonds, H. R. Udseth, R. D. Smith, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 693.
- [58] a) C. Borchers, Diplomarbeit, Universität Konstanz, **1992**; b) M. O. Glocker, C. Borchers, M. Przybylski, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [59] M. Svoboda, A. Bauhofer, P. Schwind, E. Bade, I. Rasched, M. Przybylski, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1206*, 35.
- [60] M. O. Glocker, C. Borchers, W. Fiedler, D. Suckau, M. Przybylski, *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 583.
- [61] a) J. C. Y. Le Blanc, D. Beuchemin, K. W. M. Siu, R. Guevremont, S. S. Berman, *Org. Mass Spectrom.* **1991**, *26*, 831; b) A. U. Mirza, S. K. Cohen, B. T. Chait, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1.
- [62] a) V. Katta, B. T. Chait, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8534; b) J. A. Loo, R. R. Ogorzalek-Loo, H. R. Udseth, C. G. Edmonds, R. G. Smith, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 101.
- [63] a) V. Katta, B. T. Chait, *Proc. 39th Conf. Am. Soc. Mass. Spectrom. Allied Topics* **1991**, *1247*; b) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 214.
- [64] a) M. O. Glocker, E. Dürr, C. Borchers, M. Przybylski, *Proc. 42nd Conf. Am. Soc. Mass. Spectrom. Allied Topics* **1994**, *793*; b) R. Schuhmacher, Diplomarbeit, Universität Konstanz, **1993**.
- [65] a) K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley-Interscience, New York, **1986**; b) C. K. Woodward, L. M. Ellis, A. Rosenberg, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 440.
- [66] a) F. M. Hughson, P. E. Wright, R. L. Baldwin, *Science* **1990**, *249*, 1544; b) H. Roder, G. A. Elore, S. W. Englander, *Nature* **1988**, *335*, 700.
- [67] D. Suckau, Y. Si, S. C. Beu, M. W. Senko, J. P. Quinn, F. M. Wampler, F. W. McLafferty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 790.
- [68] B. E. Winger, K. J. Light-Wahl, A. L. Rockwood, R. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5897.
- [69] a) R. R. Ogorzalek-Loo, H. R. Udseth, J. L. Fulton, R. D. Smith, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, *6*, 159; b) R. R. Ogorzalek-Loo, H. R. Udseth, R. D. Smith, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1992**, *3*, 695.
- [70] S. A. McLuckey, G. J. Van Berk, G. L. Glish, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5668.
- [71] a) D. Suckau, M. Mak, M. Przybylski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5630; b) M. Przybylski, C. Borchers, D. Suckau, M. Mak, M. Jetschke in *Peptides 1992* (Hrsg.: C. H. Schneider, A. N. Eberle), Escom, Amsterdam, **1993**, *S. 83*.
- [72] T. Imoto, L. N. Johnson, A. C. T. North, D. C. Phillips, J. A. Rupley in *The Enzymes*, Vol. 7 (Hrsg.: P. D. Boyer), Academic Press, New York, **1972**, *S. 666*.
- [73] a) M. Przybylski, M. O. Glocker, U. Nestel, V. Schnable, K. Diederichs, J. Weckesser, M. Schad, A. Schmid, W. Welte, R. Benz, *Protein Sci.* **1996**, im Druck; b) V. Schnable, Diplomarbeit, Universität Konstanz, **1995**.
- [74] a) V. Katta, B. T. Chait, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8534; b) R. Feng, Y. Konishi, *Proc. 40th Conf. Am. Soc. Mass Spectrom. Allied Topics* **1992**, *1635*.
- [75] B. E. Winger, K. J. Light-Wahl, R. R. Ogorzalek-Loo, H. R. Udseth, R. D. Smith, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 536.
- [76] R. D. Smith, K. J. Light-Wahl, B. E. Winger, J. A. Loo, *Org. Mass Spectrom.* **1992**, *27*, 811.
- [77] a) R. B. Cody, J. Tamura, J. W. Finch, B. D. Musselman, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, *5*, 194; b) A. N. Verentchikov, W. Ens, K. G. Standing, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 126.
- [78] W. Weinmann, M. Przybylski, C. E. Parker, K. B. Tomer, *Proc. 41st Conf. Am. Soc. Mass Spectrom. Allied Topics* **1993**, *743*.
- [79] a) M. Schuhmacher, M. Wunderlin, M. Przybylski, *Proc. 43rd Conf. Mass Spectrom. Allied Topics* **1995**, *618*; b) M. Schuhmacher, Diplomarbeit, Universität Konstanz, **1994**.
- [80] B. Ganem, Y. T. Li, H. J. D. Henion, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7818.
- [81] M. Schindler, Y. Assaf, N. Sharon, D. M. Chipman, *Biochemistry* **1977**, *16*, 423.
- [82] S. J. Perkins, L. N. Johnson, D. C. Phillips, R. A. Dwek, *Biochem. J.* **1981**, *193*, 553.
- [83] K. J. Lumb, R. T. Aplin, S. E. Radford, D. B. Archer, D. J. Jeenes, N. Lambert, D. A. MacKenzie, C. M. Dobson, G. Lowe, *FEBS Lett.* **1992**, *296*, 153.
- [84] a) C. C. F. Blake, L. N. Johnson, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, V. R. Sarma, *Proc. R. Soc. London Ser. B* **1967**, *167*, 378; b) C. B. Post, M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 1317.
- [85] a) D. B. Smith, K. M. Davern, P. G. Board, W. U. Tin, E. G. Garcia, G. F. Mitchell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 8703; b) A. Ruppel, R. Burger, R. Dell, H. J. Diesfeld, J. E. Shi, D. Wei, *Immunobiology* **1986**, *83*, 8703.
- [86] a) M. R. Jetschke, M. O. Glocker, C. Adomat, M. Przybylski, *Proc. Int. ISSX-Workshop Glutathione S-transferases* **1995**, *7*, 73; b) C. Adomat, Diplomarbeit, Universität Konstanz, **1993**; c) M. Przybylski, M. O. Glocker, *Bioconjugate Chem.* **1996**, im Druck.
- [87] M. H. Allen, I. A. S. Lewis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1989**, *3*, 255.
- [88] a) Y. T. Li, Y. L. Hsieh, J. D. Henion, B. Ganem, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 631; b) Y. T. Li, Y. L. Hsieh, H. K. Lim, J. Henion, B. Ganem, *Proc. 41st Conf. Am. Soc. Mass Spectrom. Allied Topics* **1993**, *262*.
- [89] E. C. Huang, B. N. Pramanik, A. Tsaropoulos, P. Reichert, A. K. Ganguly, P. P. Trotta, T. L. Nagabushan, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 624.
- [90] M. Jaquinod, E. Leize, N. Potier, A. M. Albrecht, A. Shanzer, A. Van Dorsselaer, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2771.
- [91] A. Surovoy, D. Waidelich, G. Jung in *Peptides 1992*, (Hrsg.: C. H. Schneider, A. N. Eberle), Escom, Amsterdam, **1993**, *S. 563*.
- [92] M. Baca, B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3992.
- [93] M. Jaquinod, N. Potier, K. Klarskov, J. M. Reymann, O. Sovokine, S. Kiefer, P. Barth, V. Andriantomanga, J. F. Biellmann, A. Van Dorsselaer, *Eur. J. Biochem.* **1996**, im Druck.
- [94] J. Schneider, S. B. H. Kent, *Cell* **1988**, *54*, 363.
- [95] P. F. Alewood, R. I. Brinkworth, R. J. Dancer, B. Garnham, A. Jones, S. B. H. Kent, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 977.

- [96] P. L. Darke, C. T. Leu, L. J. Davis, J. C. Heimbach, R. E. Diehl, W. S. Hill, R. A. F. Dixon, I. S. Sigal, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 2307.
- [97] a) E. Leize, A. Jaffrezic, A. Van Dorsselaer, *J. Mass Spectrom.* **1996**, im Druck; b) P. Kopf, Diplomarbeit, Universität Konstanz, **1995**.
- [98] M. A. Weiss, T. Ellensberger, C. R. Wobbe, J. P. Lee, S. C. Harrison, K. Struhl, *Nature* **1990**, *347*, 575.
- [99] K. T. O'Neil, R. H. Hoess, W. F. DeGrado, *Science* **1990**, *249*, 774.
- [100] P. Hemmerich, A. von Mikecz, F. Neumann, O. Sözeri, G. Wolff-Vorbeck, R. Zeebelein, U. Krawinkel, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 223.
- [101] E. Blatter, Y. W. Ebright, R. H. Ebright, *Nature* **1992**, *359*, 650.
- [102] C. Cohen, D. A. D. Perry, *Proteins Struct. Funct. Gen.* **1990**, *7*, 1.
- [103] T. G. Oas, L. P. McIntosh, E. K. O'Shea, F. W. Dahlquist, P. Kim, *Biochemistry* **1990**, *29*, 2891.
- [104] E. K. O'Shea, J. D. Klemm, P. S. Kim, T. Alber, *Science* **1991**, *254*, 539.
- [105] Y. T. Li, Y. L. Hsieh, J. D. Henion, M. W. Senko, F. W. McLafferty, B. Ganem, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8409.
- [106] S. C. Beu, M. W. Senko, J. P. Quinn, F. M. Wampler, F. W. McLafferty, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 557.
- [107] H. Wendt, E. Dürr, R. M. Thomas, M. Przybylski, H. R. Bosshard, *Protein Sci.* **1995**, *4*, 1563.
- [108] a) M. Przybylski, J. Kast, M. O. Glocker, E. Dürr, H. R. Bosshard, S. Nock, M. Sprinzel, *Toxicol. Lett.* **1995**, *82/83*, 567–576; b) T. Fligge, Diplomarbeit, Universität Konstanz, **1995**.
- [109] B. Lovejoy, S. Choe, D. Cascio, D. K. McRorie, W. F. DeGrado, D. Eisenberg, *Science* **1993**, *259*, 1288.
- [110] H. Wendt, C. Berger, A. Baici, R. M. Thomas, H. R. Bosshard, *Biochemistry* **1995**, *34*, 4097.
- [111] a) M. Przybylski, M. O. Glocker, C. Maier, C. Borchers, E. Dürr, W. Fiedler, J. Kast, H. Wendt, H. R. Bosshard in *Peptides 1994* (Hrsg.: H. L. S. Maia), Escom, Leiden, **1995**, S. 42; b) S. Witte, F. Neumann, U. Krawinkel, M. Przybylski, *J. Biol. Chem.* **1996**, eingereicht.
- [112] C. Maier, K. Müller, K. Baumeister, E. Bauer, E. Hannappel, R. Nave, K. Melchers, E. Sturm, W. Gernhardt, U. Krüger, K. P. Schäfer, M. Przybylski, *Proc. 41st Conf. Am. Soc. Mass Spectrom. Allied Topics* **1993**, 351.
- [113] M. Przybylski, C. Maier, K. Häggle, E. Bauer, E. Hannappel, R. Nave, K. Melchers, U. Krüger, K. P. Schäfer in *Peptides: Chemistry, Structure and Biology* (Hrsg.: R. S. Hodges, J. A. Smith), Escom, Leiden, **1994**, S. 338.
- [114] T. E. Weaver, J. A. Whitsett, *Biochem. J.* **1991**, *273*, 249.
- [115] J. F. Lewis, A. H. Jobe, *Am. Rev. Resp. Dis.* **1993**, *147*, 218.
- [116] T. Voss, K. P. Schäfer, P. F. Nielsen, A. Schäfer, C. Maier, E. Hannappel, J. Maaßen, B. Landis, K. Klemm, M. Przybylski, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1138*, 261.
- [117] a) A. Schäfer, P. F. Nielsen, T. Voss, E. Hannappel, C. Maier, J. Maaßen, E. Sturm, K. Klemm, K. P. Schäfer, M. Przybylski in *Peptides 1990* (Hrsg.: E. Giralt, D. Andreu), Escom, Leiden, **1991**, S. 350; b) T. Curstedt, J. Johansson, P. Persson, A. Eklund, B. Robertson, B. Löwenadler, H. Jörnvall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 2985.
- [118] a) W. Weinmann, C. E. Parker, K. Baumeister, C. Maier, K. B. Tomer, M. Przybylski, *Electrophoresis* **1994**, *15*, 118; b) W. Weinmann, C. Maier, K. Baumeister, M. Przybylski, C. E. Parker, K. B. Tomer, *J. Chromatogr.* **1994**, *664*, 271.
- [119] B. L. Schwartz, J. E. Bruce, G. A. Anderson, S. A. Hofstadler, A. L. Rockwood, R. D. Smith, A. Chilkoti, P. S. Stayton, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1995**, *6*, 459.
- [120] D. F. Senear, D. C. Teller, *Biochemistry* **1981**, *20*, 3076.
- [121] A. Verentchikov, W. Ens, K. G. Standing, *Proc. 41st Conf. Am. Soc. Mass Spectrom. Allied Topics* **1993**, 4.
- [122] a) M. Claeys, L. Dillen, E. L. Esmans, *Adv. Mass Spectrom.* **1995**, *13*, 521; b) F. W. McLafferty, M. W. Senko, D. P. Little, T. D. Wood, P. B. O'Conner, J. P. Speir, R. A. Chorush, N. L. Kelleher, *ibid.* **1995**, *13*, 115.
- [123] S. A. McLuckey, G. J. Van Berkel, G. L. Glish, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1992**, *3*, 60; b) K. Bleicher, E. Bayer, *Biol. Mass Spectrom.* **1994**, *23*, 320; c) S. C. Pomerantz, J. A. Kowalak, J. A. McCloskey, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 204.
- [124] a) K. J. Light-Wahl, D. L. Springer, B. E. Winger, C. G. Edmonds, D. G. Camp, B. D. Thrall, R. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 803; b) B. Ganem, Y. T. Li, J. D. Henion, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1445.
- [125] V. Saudek, H. S. Pasley, T. Gibson, H. Gausepohl, R. W. Frank, A. Pastore, *Biochemistry* **1991**, *30*, 1310.
- [126] A. Paulus, J. I. Ohms, *J. Chromatogr.* **1990**, *507*, 113.
- [127] D. R. Goodlett, C. C. Hardin, M. Corregan, R. D. Smith, *Proc. 41st Conf. Am. Soc. Mass Spectrom. Allied Topics* **1993**, 258.
- [128] a) L. Grotjahn, L. C. E. Taylor, *Org. Mass Spectrom.* **1985**, *20*, 146; b) S. A. McLuckey, S. Habibi-Goudarzi, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12085.
- [129] a) J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1989**; b) J. Meinkoth, G. Wahl, *Anal. Biochem.* **1984**, *138*, 267; c) A. G. Polson, P. F. Crain, S. C. Pomerantz, J. A. McCloskey, B. L. Bass, *Biochemistry* **1991**, *30*, 11507; d) E. Bruenger, J. A. Kowalak, Y. Kuchino, J. A. McCloskey, H. Mizushima, K. O. Stetter, P. F. Crain, *FASEB J.* **1993**, *7*, 196.
- [130] E. Uhlmann, A. Peymann, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 544.
- [131] a) Y. L. Hsieh, Y.-T. Li, J. D. Henion, B. Ganem, *Biol. Mass Spectrom.* **1994**, *23*, 272; b) D. C. Gale, D. R. Goodlett, K. J. Light-Wahl, R. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6027.
- [132] H. E. Moser, P. B. Dervan, *Science* **1987**, *238*, 645.
- [133] M. D. Distefano, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 1779.
- [134] D. R. Goodlett, D. G. Camp, C. C. Hardin, M. Corregan, R. D. Smith, *Biol. Mass Spectrom.* **1993**, *22*, 181.
- [135] C. C. Hardin, T. Watson, M. Corregan, C. Bailey, *Biochemistry* **1992**, *31*, 833.
- [136] J. R. Williamson, M. K. Raghuraman, T. R. Cech, *Cell* **1989**, *59*, 871.
- [137] M. G. Ikonomou, A. T. Blades, P. Kebarle, *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1989.
- [138] M. Sprinzel, *Trends Biol. Sci.* **1994**, *19*, 245.
- [139] M. O. Glocker, S. Nock, M. Sprinzel, M. Przybylski, *Proc. 43rd Conf. Am. Soc. Mass Spectrom. Allied Topics* **1995**, 1330.
- [140] a) E. C. Constable, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 418; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 407; b) *Nature* **1990**, *346*, 314.
- [141] a) J.-M. Lehn, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1347; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 1304; b) P. Baxter, J.-M. Lehn, A. DeCian, J. Fischer, *ibid.* **1993**, *105*, 92 bzw. **1993**, *32*, 69.
- [142] a) D. Philp, J. F. Stoddart, *Synlett* **1991**, 445; b) J. F. Stoddart, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 860; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 846.
- [143] H. Ringsdorf, B. Schlarb, J. Venzmer, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 117; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 113.
- [144] a) C. O. Dietrich-Buchecker, J. P. Sauvage, *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 795; b) C. O. Dietrich-Buchecker, B. Frommberger, I. Luer, J. P. Sauvage, F. Vögtle, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1526; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1434.
- [145] a) J. F. Stoddart, *Guest-Host Molecular Interactions: from Chemistry to Biology*, Wiley, Chichester, **1991**, S. 5–22; b) C. Seel, F. Vögtle, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 542; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 528.
- [146] U. Koert, M. M. Harding, J.-M. Lehn, *Nature* **1990**, *346*, 339.
- [147] J. S. Nowick, Q. Feng, T. Tjivikua, P. Ballester, J. Rebek, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8831.
- [148] E. Leize, A. Van Dorsselaer, R. Krämer, J.-M. Lehn, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 990.
- [149] P. R. Ashton, C. L. Brown, J. R. Chapman, R. T. Gallagher, J. F. Stoddart, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 7771.
- [150] J. C. Chambron, V. Heitz, J. P. Sauvage, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, *1131*.
- [151] R. Krämer, J.-M. Lehn, A. Marquis-Rigault, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5394.
- [152] F. Bitsch, C. O. Dietrich-Buchecker, A. K. Khemiss, J. P. Sauvage, A. Van Dorsselaer, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4023.
- [153] V. Katta, S. K. Chowdhury, B. T. Chait, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5348.
- [154] S. R. Wilson, A. Yasmin, Y. Wu, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6941.
- [155] a) P. R. Ashton, T. T. Goodnow, A. E. Kaifer, M. V. Reddington, A. M. Z. Slawin, N. Spencer, J. F. Stoddart, C. Vincent, D. J. Williams, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 1404; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 1396; b) P. R. Ashton, D. Philp, J. F. Stoddart, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, *1124*.
- [156] A. Pfeil, J.-M. Lehn, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 838.
- [157] E. C. Constable, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 10013.
- [158] C. E. Ballou, A. Dell, *Carbohydr. Res.* **1985**, *140*, 139.
- [159] K. Schneider, P. F. Nielsen, D. Suckau, M. Przybylski in *Mass Spectrometry of Large Non-Volatile Molecules* (Hrsg.: E. Hill, A. Tuczynski), World Sci., Singapur, **1990**, S. 176.
- [160] a) F. Hillenkamp, M. Karas, *Methods Enzymol.* **1990**, *193*, 280; b) R. Beavis, B. T. Chait, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1989**, *3*, 323; c) M. Karas, U. Bahr, A. Ingendoh, F. Hillenkamp, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 805; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 760.
- [161] A. Overberg, A. Hassenbürger, F. Hillenkamp in *Mass Spectrometry in the Biological Sciences* (Hrsg.: M. Gross, G. Sindona), Kluwer, Dordrecht, **1994**, S. 181.
- [162] a) J. P. Sauvage, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 319; b) D. B. Amabilino, P. R. Ashton, A. S. Reder, N. Spencer, J. F. Stoddart, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 450; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 433.
- [163] a) M. Born, H. Ritter, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* **1991**, *121*, 471; b) K. Häggle, M. Born, H. Ritter, M. Svoboda, M. Przybylski, *Abstr. 12th Int. Mass Spectrom. Conf.* **1991**, 196.
- [164] M. Svoboda, Dissertation, Universität Konstanz, **1993**.
- [165] B. D. Reverend, F. Liman, C. Livera, L. D. Pettit, S. Pyburn, H. Kozlowski, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1988**, 887.
- [166] R. D. Macfarlane, Z. H. Hu, S. Song, E. Pittenauer, E. R. Schmid, G. Allmaier, J. O. Metzger, W. Tuczynski, *Biol. Mass Spectrom.* **1994**, *3*, 117.
- [167] G. Allmaier, E. Pittenauer, E. R. Schmid, *Org. Mass Spectrom.* **1991**, *26*, 804.
- [168] a) D. L. Smith, Z. Zhang, *Mass Spectrom. Rev.* **1994**, *13*, 411; b) R. C. Beavis, *Org. Mass Spectrom.* **1992**, *27*, 653.
- [169] a) W. Weinmann, C. E. Parker, L. E. Deterding, D. Papac, J. Hoyes, M. Przybylski, K. B. Tomer, *J. Chromatogr.* **1994**, *680*, 353; b) A. Wattberg, Diplomarbeit, Universität Konstanz, **1995**.

- [170] M. J. F. Suter, W. T. Moore, T. B. Farmer, J. S. Cottrell, R. M. Caprioli in *Techniques in Protein Chemistry III* (Hrsg.: H. Angeletti), Academic Press, New York, 1992.
- [171] M. C. Fitzgerald, G. R. Parr, L. M. Smith, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 3204.
- [172] a) A. Overberg, M. Karas, U. Bahr, R. Kaufmann, F. Hillenkamp, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1990**, *4*, 293; b) A. Overberg, M. Karas, F. Hillenkamp, *ibid.* **1991**, *5*, 128.
- [173] E. A. Merritt, S. Sarfaty, F. van den Akker, C. L'Hoir, J. A. Martial, W. G. J. Hol, *Protein Sci.* **1994**, *3*, 166.
- [174] J. Drenth, *Principles of Protein X-Ray Crystallography*, Springer, New York, 1994.
- [175] A. Bax, *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, *58*, 223.
- [176] Y. Hagiwara, Y. Tany, Y. Goto, *J. Mol. Biol.* **1994**, *237*, 336.
- [177] P. Kebarle, L. Tang, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 972A.
- [178] J. P. Speir, M. W. Senko, D. P. Little, J. A. Loo, F. W. McLafferty, *J. Mass Spectrom.* **1995**, *30*, 39.
- [179] A. Miranker, C. V. Robinson, J. E. Radford, R. T. Aplin, C. M. Dobson, *Science* **1993**, *262*, 896.
- [180] M. A. Lemmon, J. M. Flanagan, H. R. Treutlein, J. Zhang, D. M. Engelman, *Biochemistry* **1992**, *31*, 12719.
- [181] A. Plückthun, *Immun. Rev.* **1992**, *130*, 152.
- [182] R. E. Bird, K. D. Hardman, J. W. Jacobson, S. Johnson, B. M. Kaufman, S. M. Lee, T. Lee, S. H. Pope, G. S. Riordan, M. Whitlow, *Science* **1988**, *242*, 423.
- [183] a) K. Falk, O. Rötschke, S. Stefanovic, G. Jung, H. G. Rammensee, *Nature* **1991**, *351*, 290; b) J. W. Metzger, K. H. Wiesmüller, V. Gnau, J. Brünjes, G. Jung, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 901; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 894.
- [184] J.-M. Lehn, M. Mascal, A. DeCian, J. Fischer, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 479.
- [185] F. H. Kohnke, J. P. Mathias, J. F. Stoddart in *Molecular Recognition: Chemical and Biochemical Problems* (Hrsg.: S. M. Robert), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1989**, S. 233.

VERANSTALTUNGEN

IRaP 96

2nd International Symposium on Ionizing Radiation and Polymers

Nov. 3-8, 1996, Saint-François, Guadeloupe, FWI

IRaP96 is the second symposium of an international series devoted to ionizing radiation effects in polymers. IRaP conferences bring together scientists from research, universities and industries involved in radiation polymer science. Their aim is to facilitate the exchange of knowledge and information in this cross-disciplinary field and to promote innovative industrial applications. The topics will cover fundamental process, surface and bulk modifications, advanced materials and technological applications. Furthermore, IRaP96 will highlight the influence of ionizing radiation on the modification of chemical and physical properties (e.g. electrical, mechanical, optical, tribological, diffusion...). In addition to electron, photon and ion beam effects, studies with lasers and cluster beams in polymers will be included.

The program consists of keynote lectures, invited and contributed talks, and posters.

A particular attention is given to new materials which can find applications in medicine, biology, biotechnology, defense, environmental protection, and energy saving.

For more information and registration (before September the 15th), please contact:

Dr. Natacha BETZ

Chairwoman of IRaP 96 organizing committee

DRECAM/SRSIM/LPI

CEA/Saclay

F - 91191 Gif sur Yvette Cedex

tel.: (33) 1 69 08 48 34 ; fax : (33) 1 69 08 96 00

e-mail : betz@drecam.cea.fr; irap@drecam.cea.fr