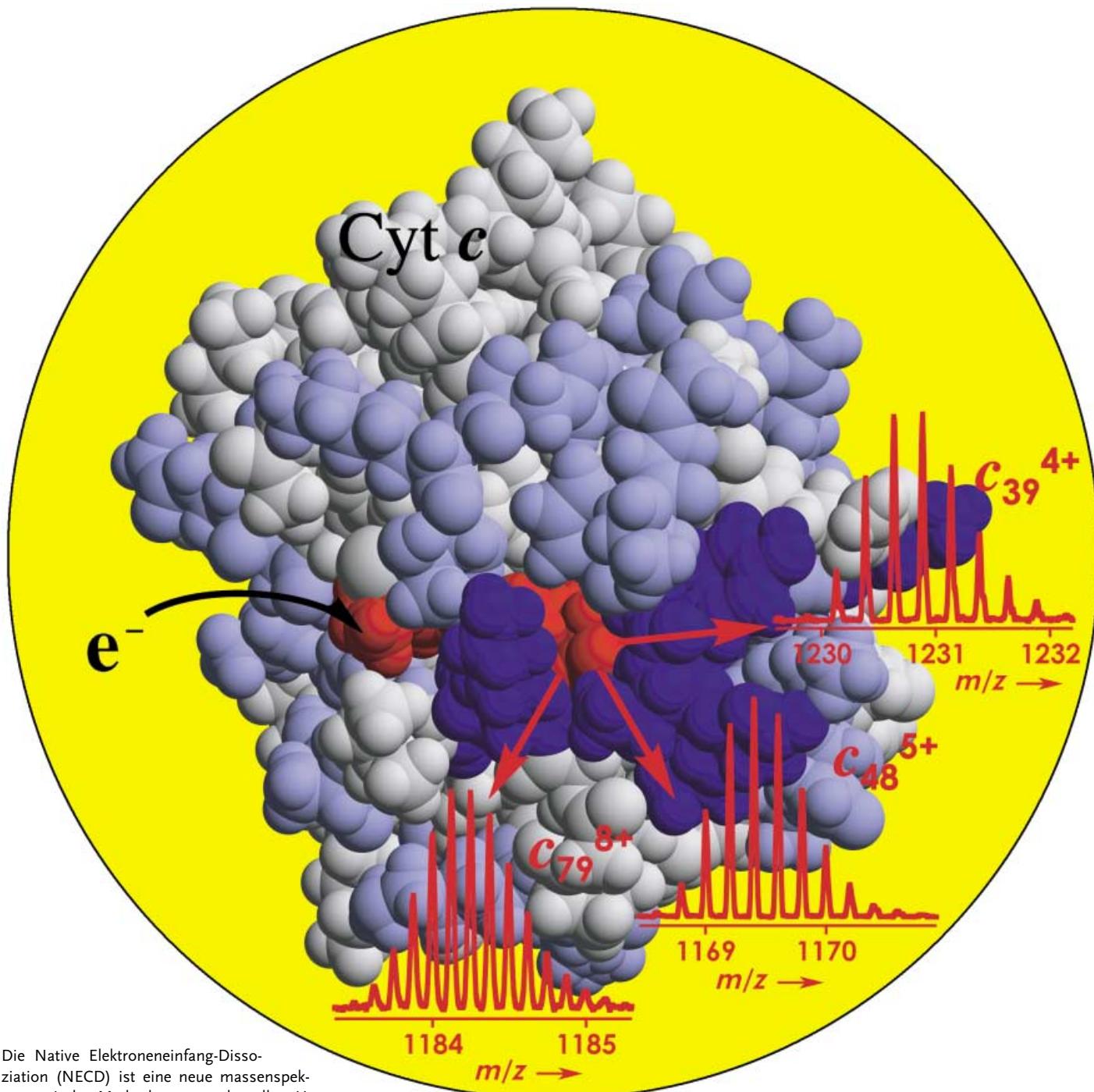


Zuschriften



Die Native Elektroneneinfang-Dissoziation (NECD) ist eine neue massenspektrometrische Methode zur strukturellen Untersuchung von nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen wie Cytochrom *c*. Wie K. Breuker und F. W. McLafferty auf den folgenden Seiten erläutern, werden im Unterschied zu konventionellen ECD-Techniken keine externen Elektronen zugeführt, da die hoch asymmetrische Ladungsverteilung bei der Dissoziation von Proteindimeren den Elektronentransfer bewirkt.

Native Elektroneneinfang-Dissoziation zur strukturellen Charakterisierung nichtkovaler Wechselwirkungen in nativem Cytochrom c**

Kathrin Breuker* und Fred W. McLafferty

Jüngste Forschungen in der biomolekularen Massenspektrometrie (MS) zielen auf Aufgabenstellungen der Life Sciences ab, die über Molekulargewichtsbestimmung und Protein-Identifizierung hinaus gehen,^[1] z. B. in Untersuchungen nichtkovaler Proteinkomplexe^[2] und der Proteinfaltung.^[2b,3] In Elektrospray-Ionisations(ESI)-MS-Experimenten kann die Stöchiometrie von Bindungs-partnern in Protein-Protein-, Protein-Ligand- und Protein-Nukleinsäure-Komplexen bestimmt werden,^[2] vorausgesetzt, dass etwaige Veränderungen der nichtkovalen Bindungen bei Eintritt in die Gasphase diese Stöchiometrie nicht beeinflussen. Umfassende Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoff-brücken in der Gasphase geschwächt bzw. gestärkt werden und dass sich Tertiärstrukturen in der Gasphase drastisch von den Strukturen in Lösung unterscheiden können.^[4] Die detailliertesten Informationen über solche strukturell veränderten Gasphasen-konformere aus ESI-Experimenten wurden kürzlich durch Elektroneneinfang-Dissoziation (electron capture dissociation, ECD) erhalten.^[4d,g,h,5] Hier berichten wir über Massenspektren, die dagegen die *native* Proteinstruktur reflektieren, und die offenbar ECD-Massenspektren sind, obwohl experimentell *keine* Elektronen zugegeben wurden. Wir nennen diese neue Technik Native Elektroneneinfang-Dissoziation (NECD).

Cytochrom c (Cyt c), ein kleines Elektronentransfer-Protein mit annähernd sphärischer Gesamtform im nativen Zustand (Abbildung 1),^[6] gehört zu den am genauesten untersuchten Proteinen bezüglich Struktur und Faltung in der Gasphase.^[2c,3,4a-4f] Mit ESI von Cyt c-Lösungen, in denen die native Struktur erhalten ist (pH 3.5, 4.5), in ein Fourier-Transformations(FT)-Massenspektrometer ergab ECD der 8+ - und 9+ -Molekülionen (MS/MS) keine Produkt-Ionen aus Rückgratfragmentierung; die nichtergodische ECD spaltet das Proteinrückgrat ohne Bruch der nichtkovalenen Bindungen der Tertiärstruktur.^[4d,g,h] Nach Denaturierung der Molekülionen durch sanfte Kollisionsanregung^[5d] finden sich im ECD-Spektrum Fragmente aus der Spaltung von 69 der

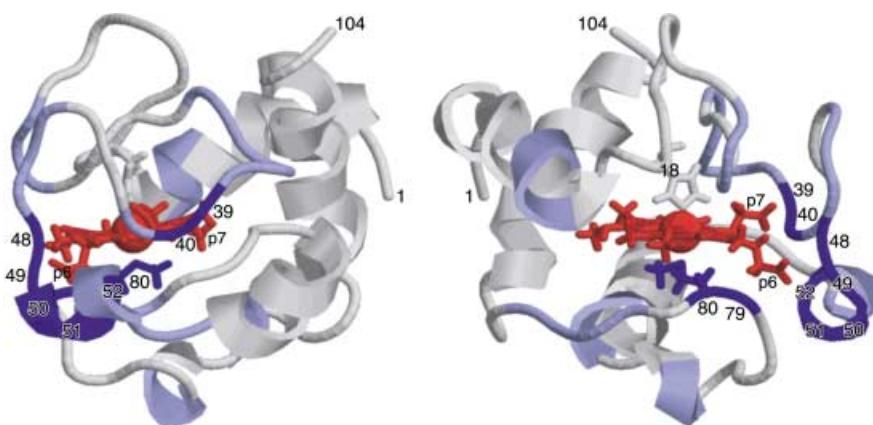
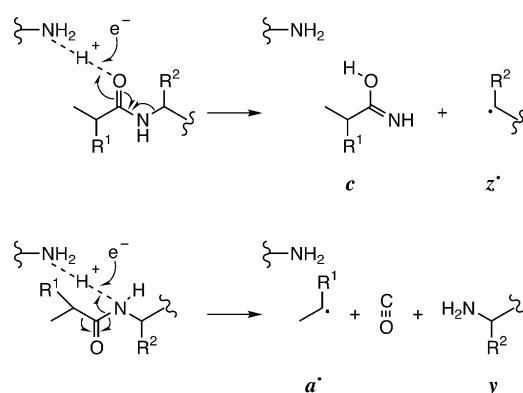


Abbildung 1. Bänder-Stab-Darstellung von nativem (Fe^{III})Cyt c (Struktur in Lösung aus der PDB-Datei^[17] 1AKK^[11a]). Rot: Häm; blau: angrenzende Aminosäurereste 39, 40, 48–52, 79 und 80 von NECD-Hauptfragmentierungen in Abbildungen 2b, c; hellblau: angrenzende Aminosäurereste 11–13, 26–28, 33–38, 41, 45–47, 53–55, 68, 69, 72, 73 und 82–85 von weniger intensiven NECD-Fragmentierungen. Die Darstellungen unterscheiden sich um eine 120°-Drehung um die vertikale Achse.

103 Rückgratbindungen (Abbildung 2a). Gemäß dem ECD-Radikalmechanismus (Schema 1) entstehen die charakteristischen Produkte *c*, *z* und *a* (sowie *y*-Ionen); Spektren nach konventioneller Ionendissoziation durch energetische Spaltung (z. B. durch Kollisionsanregung (CAD) oder IR-Multi-



Schema 1. Mechanismus der ECD-Fragmentierung; das Proton befindet sich ursprünglich an einem angrenzenden basischen Aminosäurerest.

[*] Dr. K. Breuker
Institut für Organische Chemie
Universität Innsbruck
Innrain 52a, 6020 Innsbruck (Österreich)
Fax: (+43) 512-507-2892
E-mail: kbreuker@gmx.net

Prof. Dr. F. W. McLafferty
Department of Chemistry and Chemical Biology
Baker Laboratory
Cornell University
Ithaca, NY 14853-1301 (USA)

[**] Die Autoren danken dem österreichischen Fonds zur Förderung der Wissenschaften (FWF Projekt P15767, KB) und den National Institutes of Health (NIH Projekt GM16609, FWM), Dr. Rich Knochenmuss, Prof. Dr. Bernhard Kräutler, Huili Zhai, Dr. Vlad Zabrouskov, Dr. Cheng Lin und Xuemei Han für Diskussionen und Pieter Dörrestein für die Aufnahme von UV/Vis-Spektren.

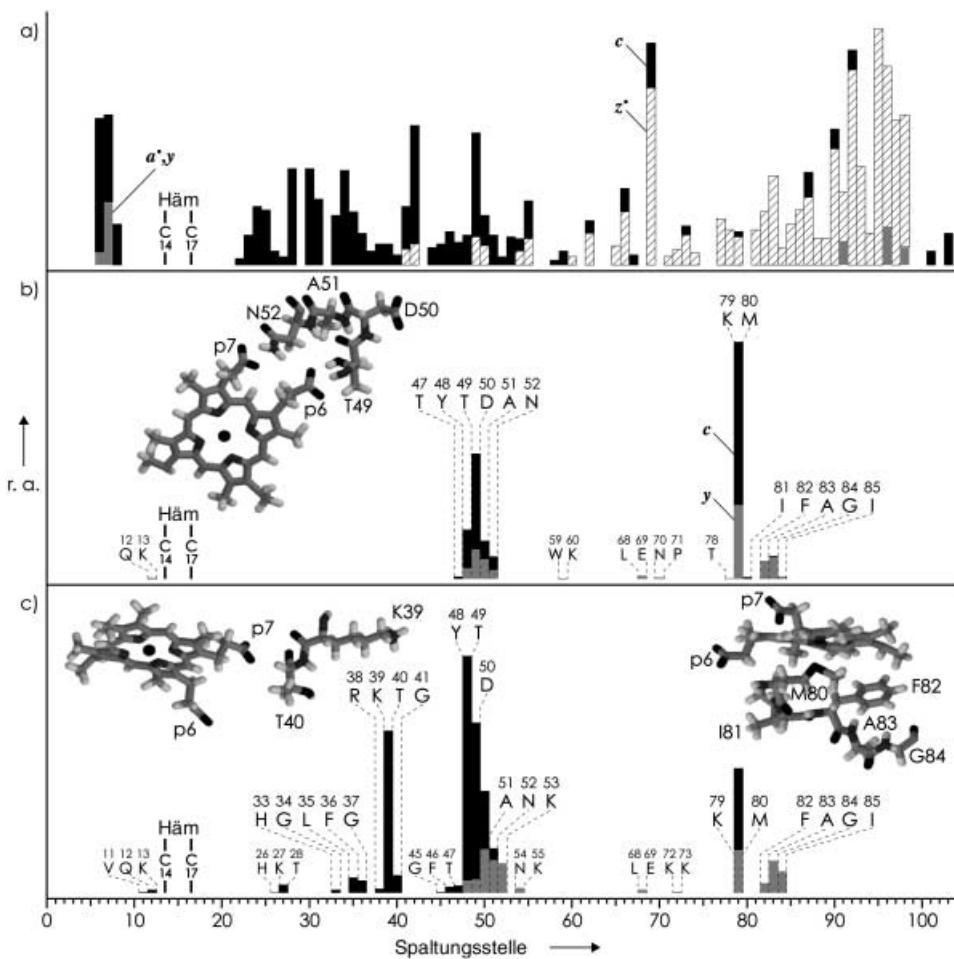


Abbildung 2. Relative Häufigkeit (r.a.) von Cyt c-Fragment-Ionen: a) Spektrum nach konventioneller ECD von Molekülionen aus ESI von $10 \mu\text{M}$ wässriger Lösung (pH 3.5; In-Beam-Kollisionsanregung).^[5d] b, c) ESI-Spektrum von $75 \mu\text{M}$ wässriger Lösungen (pH 4.5) ohne externe Zugabe von Elektronen, beide 36% NECD-Ausbeute, mit partiellen Strukturen des Häms und benachbarter Aminosäuren in nativem ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cyt c}$). c) Spektrum nach 1 h zusätzlichem Röhren der ESI-Lösung mit einem Vortex-Schüttler. c-Ionen: schwarze Balken, y-Ionen ($\alpha + \gamma$ in a): graue Balken, z-Ionen: gestreifte Balken.

photonendissoziation (IRMPD)) von Protein-Ionen zeigen dagegen **b**- ($\text{RC}\equiv\text{O}^+$) sowie **y**-Ionen. Deshalb war es überraschend, **c**-Ionen in einem ESI-Spektrum von Cyt c (Abbildung 2b) zu finden, das ohne Zugabe von Elektronen unter Bedingungen aufgenommen wurde, die keine **b**-Ionen produzieren. Weitere Produkte in Abbildung 2b waren **y**-Ionen, die generell durch Spaltung zwischen denselben Aminosäuren wie für die **c**-Ionen entstanden. Die Abbildungen 2a und b weisen wenig Ähnlichkeit auf: Die bevorzugte Spaltung zwischen Lys 79 und Met 80 in Abbildung 2b gehört zu den am schwächsten ausgeprägten in Abbildung 2a. Unter sonst gleichen Bedingungen wurden nach rigorosem Röhren der Cyt c-Lösung Spektren wie in Abbildung 2c erhalten. Diese scheinen eine Kombination aus dem Spektrum in Abbildung 2b und einem neuen Spektrum zu sein, dessen Zustandekommen noch untersucht wird. Obwohl experimentell keine zusätzlichen Elektronen zugeführt wurden, ist die Ausbeute von 36% an Produkt-Ionen **c** und **y** größer als bei frühen ECD-Studien.^[5a]

Die Konzentration der ESI-Lösung beeinflusst drastisch die Ausbeute an Fragment-Ionen (Abbildung 3). In Fluores-

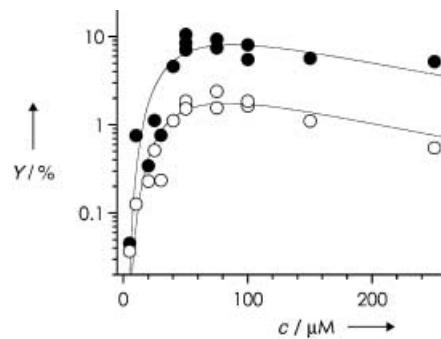


Abbildung 3. Ausbeute (Y) der Ionen **c**, **y** (gefüllte Kreise) und c_{79} (offene Kreise) nach ESI von ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cyt c}$ in H_2O als Funktion der Konzentration bei pH 5.5.

zenz-Studien wurde bei Konzentrationen von mehr als $33 \mu\text{M}$ die Dimerisierung von Cyt c in Elektrospray-Tröpfchen beobachtet.^[7] Der entsprechende Anstieg in Abbildung 3 lässt darauf schließen, dass zur Bildung von **c** und **y** Dimeren erforderlich sind (allerdings wurden in keinem der Spektren

Dimer-Ionen detektiert). Die Ausbeute an Fragment-Ionen sinkt bei Werten von über 100 μM wieder ab, vermutlich wegen der kompetitiven Bildung von größeren Aggregaten. Der pH-Wert der Lösung wirkt sich ebenfalls auf die Ausbeute aus. Bei 100 μM Cyt c in wässriger Lösung wurden folgende Ausbeuten erhalten: pH 2.5 5% (0% in 70% MeOH), pH 3.5 13%, pH 4.5 16% und pH 5.5 7% (Zusatz von 1% Glycerin^[8] hatte keinen Einfluss). Diese Daten sind konsistent mit der abnehmenden Denaturierung von nativem Cyt c beim Übergang von pH 2.5 nach 4.5^[9] und einem niedrigeren Protonierungsgrad während der ESI bei höherem pH-Wert. Die Ausbeute hing außerdem stark von der Temperatur der Kapillare ab, durch die die Ionen in das Massenspektrometer eintreten. Bei 75 μM und pH 5 bewirkte eine Abkühlung von 43°C auf 28°C eine Abnahme der Ausbeute an **c** und **y** von 21% auf 2% (Abbildung 4)

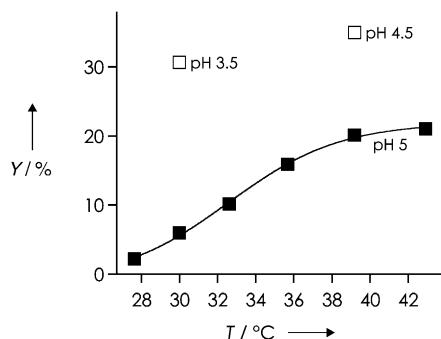


Abbildung 4. Ausbeute (Y) der Ionen **c** und **y** nach ESI von 75 μM (Fe^{III})Cyt c-Lösungen in Wasser als Funktion der Kapillarentemperatur, gemessen an der Kapillarenöffnung, durch die die Ionen in das Massenspektrometer eintreten. Die Temperaturen im Inneren der Kapillare sind um einen geschätzten Faktor 2 proportional höher.

gegenüber den verbliebenen Molekülionen. Durch Absenken des pH-Werts auf 3.5 bei 30°C wurde eine Ausbeute von 31% erhalten. Die Bildung der **c**- und **y**-Ionen muss – vor extensiver Verdampfung des Lösungsmittels – in dieser Kapillarregion stattfinden und erfordert signifikant mehr Energie als die Desolvatation. Die Änderung instrumenteller Parameter in Bereichen geringeren Drucks, z.B. der Düse-Skimmer-Spannung und der damit verbundenen Ionenlinsenpotentiale, hatte keinen Effekt.

Das **c,y**-Fragmentierungsmuster aus ESI von 100 μM (Fe^{II})Cyt c-Lösungen^[10] in Wasser bei pH 4.5 (Daten nicht gezeigt) war innerhalb der Fehlergrenzen identisch mit dem von (Fe^{III})Cyt c; die nativen Fe^{III} - und Fe^{II} -Strukturen unterscheiden sich in erster Linie durch die Reorientierung einiger weniger Aminosäurereste.^[11] Weiter haben alle Produkte **c**, in denen das Häm kovalent an Cys 14 und Cys 17 gebunden ist, sowohl aus Fe^{III} - als auch Fe^{II} -Lösungen *m/z*-Werte, die eine Reduktion zu Fe^{II} anzeigen. Dies lässt darauf schließen, dass ein effizienter Elektronentransfer die Bildung von Fe^{II} -Produkten aus den Fe^{III} -Vorstufen bewirkt. Aus der gleichen Quelle könnte ein Elektron stammen, das die ECD unter Bildung der beobachteten Produkte **c** und **y** bewirkt, allerdings weisen die Spektren in Abbildung 2b,c keine der erwarteten komplementären (Schema 1) Produkte **z** und **a**

auf. Diese hochreaktiven und thermisch labilen Radikalspezies^[4g] sind allerdings vielen energetischen Kollisionen auf dem Weg durch die Kapillarregion ausgesetzt.

Eine ungewöhnliche MS/MS-Disssoziation von stabilen gasförmigen Cyt c-Dimer-Ionen aus ESI von nichtdenaturierenden Lösungen und Speicherung in einer FTMS-Zelle wurde kürzlich von Williams und Jurchen beschrieben.^[12] Bei schwacher MS/MS-Anregung (CAD) dissoziieren die Dimer-Ionen überwiegend in Monomere mit gleicher Ladungszahl, höhere Anregungsenergien bewirken dagegen eine asymmetrische Ladungsverteilung. Gleiches scheint auch für unsere Dimer-Ionen, die in der Kapillarregion dissoziieren, der Fall zu sein (Abbildung 5). ESI mit 10 μM , einer Konzentration, bei der nur geringe Ausbeuten an Dimer, **c** und **y** entstehen, produziert fast ausschließlich 8+-Monomerionen. ESI mit 75 μM – günstigen Bedingungen für die Bildung von Dimeren

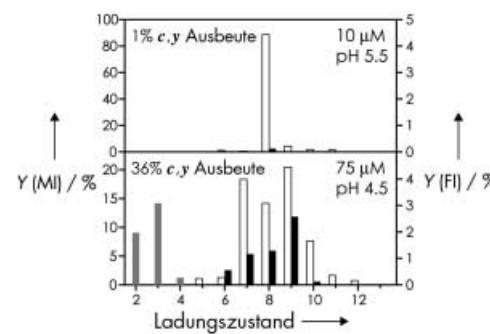
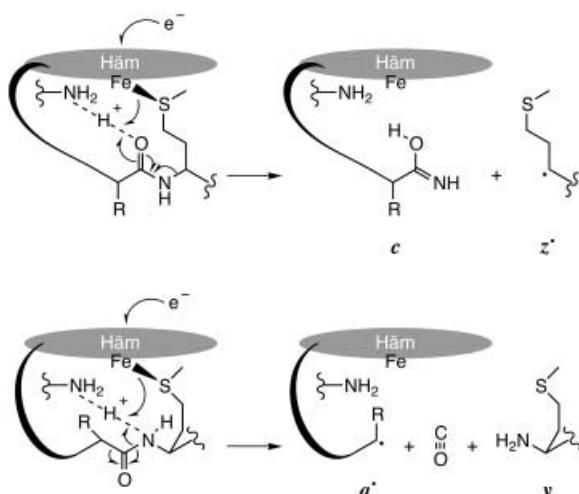


Abbildung 5. Ausbeute (Y) von Molekülionen $[\text{M} + (n-1)\text{H}]^{n+}$ (MI, offene Balken) und Fragment-Ionen $(\text{c}_{79} + n\text{H})^{n+}$ und $(\text{y}_{25} + n\text{H})^{n+}$ (FI, schwarze bzw. graue Balken) aus ESI von wässrigen (Fe^{III})Cyt c-Lösungen (10 μM , pH 5.5 und 75 μM , pH 4.5) in Abhängigkeit vom Ladungszustand.

sowie **c** und **y** – zeigt dagegen asymmetrische Ladungsverteilungen mit Ladungszuständen der Monomere von bis zu +12. Auf eine sogar noch höhere Ladung der Vorstufen von **c** und **y** weist die Summe der gemittelten Ladungen der quasikomplementären Fragmente **c**₇₉ (+8.48) und **y**₂₅ (+2.66) hin (Abbildung 5, unten). Zusammen mit den zwei Elektronen für die ECD und die Reduktion des Häm-Eisen-Zentrums ergibt sich eine Ladung von ca. +13 für ihre monomere Vorstufe. Demzufolge muss die Ladung des anderen Monomers auf +3 oder +4 dezimiert sein, was auf eine sehr starke Ladungsasymmetrie vor der Dimerdissoziation schließen lässt. Diese könnte die Elektronentransfers verursachen, die zu den Produkten **c**(Fe^{II}) und **y** führen. Williams und Jurchen liefern überzeugende Beweise, dass diese Ladungsasymmetrie bei Aktivierung der dimeren Protein-Ionen das Resultat der Entfaltung eines der beiden Monomere ist.^[12] Die vergrößerte Separation der basischen Aminosäurereste bewirkt eine starke Zunahme ihrer Basizität, wodurch Protonen vom anderen Monomer angezogen werden.

Da die **c**- und **y**-Ionen nur mit ESI von nativem Cyt c beobachtet werden, stellt sich die Frage, ob dessen Struktur^[6] auch eine mechanistische Erklärung für die hochspezifische Bildung von **c** und **y** (Abbildung 2b,c) liefern kann. Wenigs-

tens eines der beteiligten Elektronen, dasjenige, das die Fe^{II}-Produkte bildet, muss auf den Häm-Liganden übertragen werden. Das Häm ist außerdem in beiden nativen Strukturen, der Fe^{II}- und der Fe^{III}-Struktur, nichtkovalent an Aminosäurereste gebunden, an denen ein zweiter Elektronentransfer eine Spaltung des Proteinrückgrats auslösen könnte (Abbildung 2 b,c).^[11] Die betreffenden Aminosäurereste befinden sich sämtlich in der Nähe der exponierten Kante des Häm's (Abbildung 1), die als Ort des biologischen Elektronentransfers vermutet wird.^[13] Die markantesten Fragmente stammen aus Spaltungen an der N-terminalen Seite von Met 80, dessen Schwefelatom das Häm-Eisen distal koordiniert (Abbildung 1, 2). Eine weitere große Zahl von Produkten stammt aus Spaltungen in der Nähe von Thr 40, Thr 49 und Asn 52, die in (Fe^{III})Cyt c jeweils durch Wasserstoffbrücken mit den Carboxylaten der Häm-Propionate 7, 6 und 7 verbunden sind (Asn 52 ist im (Fe^{II})Cyt c durch eine Wasserstoffbrücke mit p6 verbunden).^[11] Alle anderen Produkte (< 1% der Gesamtproduktmenge) resultieren aus Spaltungen in der Nähe des Häm's, z.B. an Lys 13 und in der Region 68–71. His 18, das das Fe-Zentrum auf der Met 80 gegenüberliegenden Seite koordiniert, weist keine benachbarte ECD auf. Schema 2 untermauert die Annahme, dass diese Spaltungen,



Schema 2. Vorgeschlagener Mechanismus der NECD-Fragmentierung bei Met 80.

die während „sanfter“ ESI und ohne externe Zugabe von Elektronen stattfinden, sogar den konventionellen ECD-Mechanismus in Schema 1 einschließen können. Während das Dimer die Einlasskapillare passiert, enfaltet sich eines seiner Monomere partiell. Der Übergangszustand hoher Energie beim Entfalten in Lösung umfasst die Denaturierung der terminalen Helices (Aminosäuren 3–14 und 90–101; Abbildung 1, Bild rechts, linke Seite) durch Aufbrechen der hydrophoben Phe 10-Leu 94-Bindung zwischen den Helices. Diese Helices enthalten 8 der 21 basischen Aminosäurereste eines Monomers. Von den geschätzten 8 ursprünglichen Protonen eines Monomers sollten sich ca. 3 auf diesen Helices befinden. Durch partielle Denaturierung werden 5 Protonen vom anderen Monomer angezogen, genügend für

die Protonierung der neu exponierten basischen Stellen und einer Gesamtzahl von 8 Protonen auf den terminalen Helices. Als Folge dieser starken Ladungsasymmetrie überträgt das andere Monomer Elektronen auf das partiell entfaltete Monomer, wobei ein Elektron das Fe^{III}-Zentrum reduziert und ein weiteres auf das Häm übertragen wird. Resultat dieses Prozesses ist die in Schema 2 gezeigte ECD.

Native Cyt c-Molekülionen sind signifikant durch hydrophobe Bindungen stabilisiert,^[14] wobei die vollständige Desolvatation durch ESI ihre Denaturierung verursacht. Frühere ECD-Experimente^[4d] haben gezeigt, dass gasförmige Cyt c-Ionen nach Denaturierung in stabilere Gasphasen-Strukturen zurückfallen, die sich von den nativen Lösungsstrukturen gänzlich unterscheiden.^[4g] Obwohl die ESI von nativen Cyt c-Lösungen Molekülionen mit Ladungen $\leq +8$ erzeugen kann, deren Kollisionsquerschnitte mit dem für die native Struktur berechneten übereinstimmen,^[4e] lassen unsere Hinweise darauf schließen, dass sich die Ionen beim Transfer in die Gasphase entfaltet und zurückgefaltet haben. Diese Möglichkeit sollte in Betracht gezogen werden, bevor man konventionelle ESI-Massenspektren als Nachweis nicht-kovalenter Bindung in Lösung heranzieht.^[2]

NECD ist ein vielversprechendes neues MS-Verfahren zur strukturellen Untersuchung von nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen. Die Ladungverteilung bei der Dissoziation von Proteindimeren kann anscheinend dermaßen asymmetrisch sein, dass sie einen Elektronentransfer und die ECD des Proteinrückgrats bewirkt. Für Cyt c korrelieren die resultierenden Fragmente direkt mit nicht-kovalenten Protein-Häm-Wechselwirkungsstellen in der nativen Struktur. Obwohl dies der bisher detaillierteste Nachweis vom Erhalt nativer Konformation beim Transfer in die Gasphase zu sein scheint, zeigt NECD auch, dass es sich selbst bei „sanftem“ ESI nur um transiente Strukturen handelt. Zukünftige Arbeiten werden die Anwendungsfähigkeit von NECD überprüfen, z.B. als konformationelle Sonde zur Untersuchung der Dissoziationsdynamik von Multimeren in Lösung.

Experimentelles

Die Experimente wurden mit einem bereits beschriebenen 6-Tesla-FT-Massenspektrometer durchgeführt.^[5c] Ionen aus ESI bei Atmosphärendruck treten durch eine geheizte Kapillare in das Instrument ein und werden durch Quadrupol-Ionenleiter in die FT-ICR-Zelle geleitet ($< 10^{-9}$ Torr, Einfang mit N₂-Puls). Zur ESI wurden im Labor hergestellte Emitter mit ca. 5 μm Innendurchmesser der Spitzen verwendet (Fluss 200–500 nL min⁻¹, 1 kV Spray-Potential). Cyt c aus Pferdeherz (Sigma, St. Louis, USA) wurde in Wasser (Nanopure, pH 5.5) gelöst; die pH-Werte wurden mit Essigsäure eingestellt. Der pH-Wert der (Fe^{II})Cyt c-Lösung wurde mit Ascorbinsäure auf pH 4.5 eingestellt.^[10,4c,15] Zur Auswertung der Spektren wurde das automatisierte Programm THRASH verwendet.^[16]

Eingegangen am 23. April 2003 [Z51705]
Online veröffentlicht am 23. September 2003

Stichwörter: Cytochrom c · Elektroneneinfangdissoziation · Elektronentransfer · Massenspektrometrie · Nichtkovalente Wechselwirkungen

- [1] a) R. Aebersold, M. Mann, *Nature* **2003**, *422*, 198–207; b) F. Meng, B. J. Cargile, S. M. Patrie, J. R. Johnson, S. M. McLoughlin, N. L. Kelleher, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2923–2929; c) G. E. Reid, S. A. McLuckey, *J. Mass Spectrom.* **2002**, *37*, 663–675.
- [2] a) J. A. Loo, *Mass Spectrom. Rev.* **1997**, *16*, 1–23; b) R. L. Winston, M. C. Fitzgerald, *Mass Spectrom. Rev.* **1997**, *16*, 165–179; c) B. N. Pramanik, P. L. Bartner, U. A. Mirza, Y.-H. Liu, A. K. Ganguly, *J. Mass Spectrom.* **1998**, *33*, 911–920; d) J. A. Loo, *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *200*, 175–186; e) F. Sobott, C. V. Robinson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 729–734.
- [3] a) U. A. Mirza, S. L. Cohen, B. T. Chait, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1–6; b) C. S. Hoaglund-Hyzer, A. E. Counterman, D. E. Clemmer, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 3037–3079; c) M. F. Jarrold, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2000**, *51*, 179–207; d) I. A. Kaltashov, S. J. Eyles, *Mass Spectrom. Rev.* **2002**, *21*, 37–71.
- [4] a) D. Suckau, Y. Shi, S. C. Beu, M. W. Senko, J. P. Quinn, F. M. Wampler III, F. W. McLafferty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 790–793; b) D. E. Clemmer, R. R. Hudgins, M. F. Jarrold, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10141–10142; c) F. W. McLafferty, Z. Guan, U. Haupt, T. D. Wood, N. L. Kelleher, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4732–4740; d) D. M. Horn, K. Breuker, A. J. Frank, F. W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9792–9799; e) E. R. Badman, C. S. Hoaglund-Hyzer, D. E. Clemmer, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 6000–6007; f) R. Grandori, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 453–458; g) K. Breuker, H.-B. Oh, D. M. Horn, B. A. Cerdá, F. W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6407–6420; h) H.-B. Oh, K. Breuker, S.-K. Sze, Y. Ge, B. K. Carpenter, F. W. McLafferty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15863–15868.
- [5] a) R. A. Zubarev, N. L. Kelleher, F. W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3265–3266; b) R. A. Zubarev, N. A. Kruger, E. K. Fridriksson, M. A. Lewis, D. M. Horn, B. K. Carpenter, F. W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2857–2862; c) R. A. Zubarev, D. M. Horn, E. K. Fridriksson, N. L. Kelleher, N. A. Kruger, M. A. Lewis, B. K. Carpenter, F. W. McLafferty, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 563–573; d) D. M. Horn, Y. Ge, F. W. McLafferty, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 4778–4784.
- [6] L. Banci, M. Assfalg in *Handbook of Metalloproteins*, Vol. 1 (Hrsg.: A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos, K. Wieghardt), Wiley, New York, **2002**, S. 33–43.
- [7] S. E. Rodriguez-Cruz, J. T. Khoury, J. H. Parks, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12*, 716–725.
- [8] A. T. Iavarone, E. R. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2319–2327.
- [9] a) Y. Goto, Y. Hagihara, D. Hamada, M. Hoshino, I. Nishii, *Biochemistry* **1993**, *32*, 11878–11885; b) Y. O. Kamatari, T. Konno, M. Kataoka, K. Akasaka, *J. Mol. Biol.* **1996**, *259*, 512–523.
- [10] Die m/z -Werte von Cyt c-Molekülien aus Elektrospray von reduzierenden wässrigen Lösungen (Ascorbinsäure, Oxidationsstufe von Cyt c mit UV/Vis-Spektroskopie bestätigt) waren $[M+nH]^{n+}$, (konsistent mit Fe^{II}); ESI von $(Fe^{III})Cyt c$ ergab $[M+(n-1)H]^{n+}$.
- [11] a) L. Banci, I. Bertini, H. B. Gray, C. Luchinat, T. Reddig, A. Rosato, P. Turano, *Biochemistry* **1997**, *36*, 9867–9877; b) L. Banci, I. Bertini, J. G. Huber, G. A. Spyroulias, P. Turano, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 21–31.
- [12] J. C. Jurchen, E. R. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2817–2826.
- [13] a) J. Rawlings, S. Wherland, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 2177–2180; b) A. J. Ahmed, F. Millett, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 1611–1615; c) W. H. Koppenol, E. Margoliash, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 4426–4437; d) H. S. Pappa, T. L. Poulos, *Biochemistry* **1995**, *34*, 6573–6580.
- [14] L. Hoang, S. Bédard, M. M. G. Krishna, Y. Lin, S. W. Englander, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12173–12178.
- [15] a) F. He, C. L. Hendrickson, A. G. Marshall, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 120–126; b) K. A. Johnson, B. A. Shira, J. L. Anderson, I. J. Amster, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 803–808.
- [16] D. M. Horn, R. A. Zubarev, F. W. McLafferty, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 320–332.
- [17] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242.