

Photodissoziation durch UV-Licht: Anwendungen in der massenspektrometrischen Proteomforschung

Tony Ly und Ryan R. Julian*

Laser · Massenspektrometrie · Phosphorylierung ·
Radikale · Sequenzierung

Die Auswertung aller Informationen in einem Proteom ist eine Herausforderung für die chemische Analyse, doch winkt als Lohn ein enormer Wissenszuwachs. Die Massenspektrometrie bietet eine einmalige Auswahl an Verfahren für verschiedene Ansätze der Proteomanalyse. Vor kurzem wurde gezeigt, dass man mit UV-Bestrahlung eine eindeutige Fragmentierung von Peptiden und Proteinen induzieren kann. Dabei ist eine unspezifische Dissoziation ebenso möglich wie eine hochspezifische Dissoziation an künstlich eingeführten Chromophoren, nachdem diese ein Photon absorbiert haben. Die Spezifität und Kontrollierbarkeit der Fragmentierung in solchen Experimenten sind besser als bei anderen Fragmentierungsverfahren. Von neuen Methoden, die auf dieser Technik beruhen, erwartet man wichtige Beiträge zur Proteomforschung.

1. Einleitung

Die Leistungsfähigkeit von Massenspektrometern wird ständig verbessert. Höhere Auflösung^[1] und Empfindlichkeit,^[2] ein größerer dynamischer Messbereich^[3] und verbesserte Ionenquellen^[4,5] haben die Untersuchung von Proteinen^[6] und anderen Biomolekülen^[7] deutlich vorangebracht. Ungeachtet ihrer Leistungsfähigkeit können Massenspektrometer grundsätzlich nur das Masse/Ladungs-Verhältnis und die relative Häufigkeit von Ionen bestimmen. Über das Molekulargewicht des intakten Moleküls, das an sich schon eine wichtige Messgröße ist, hinaus liefern moderne Massenspektrometer normalerweise wesentlich mehr Informationen. So lässt sich aus dem Fragmentierungsmuster oft die Konstitution der kovalenten Bindungen von großen und kleinen Molekülen ableiten.^[8] Auch nichtkovalente Wechselwirkungen können zur Bestimmung der Quartärstruktur^[9] oder der Tertiärstruktur von Proteinen in Lösung^[10] untersucht werden. Austauschreaktionen können Aufschluss über das Verhalten in der Gas- und in der Flüssigphase geben.^[11–13] Die Ionenbeweglichkeit kann bei der Massenspektrometrie in verschiedener Weise für schnelle Trennungen genutzt wer-

den^[14,15] oder um in der Gasphase intakte Strukturen zu untersuchen.^[16] Mit Bildgebungsverfahren lassen sich die räumlichen Beziehungen zwischen den Komponenten in komplexen Proben wie Geweben bestimmen.^[17] Massenspektrometrische Studien können somit sehr verschiedene Erkenntnisse

liefern, auch wenn immer nur das Masse/Ladungs-Verhältnis und die relative Häufigkeit gemessen werden.

Es ist nicht verwunderlich, dass Massenspektrometer häufig mit Lasern gekoppelt wurden. Laser verschiedener Größen, Stärken und Wellenlängen wurden in viele Ionenquellen eingebaut und zur Ionisierung, Dissoziation und zur Spektroskopie verwendet.^[18] Obwohl die Kombination von UV-Lasern mit Massenspektrometern bereits eine lange Geschichte hat,^[19–21] die auch einige elegante Experimente mit mehreren Lasern umfasst,^[22,23] hat sich die Methode der lasergestützten Photodissoziation erst in neuerer Zeit allgemein durchgesetzt. Fortschritte bei Lasern und in der Massenspektrometrie haben die Kombination beider Felder zu einer aufstrebenden Technik vorangetrieben, welche die etablierten Methoden mit niederenergetischen Photonen ergänzt.^[24]

Ein Arbeitsgebiet, in dem die Massenspektrometrie nach wie vor eine entscheidende Rolle spielt, ist die Proteomforschung, wie in verschiedenen Übersichten im Einzelnen dargestellt ist.^[25–27] Die technischen und chemischen Herausforderungen bei diesen Arbeiten liegen darin begründet, dass Proteine – ebenso wie ihre Umgebung – divers und komplex sind. Die relativen Häufigkeiten von Proteinen umfassen einen Bereich von mindestens 10 Größenordnungen.^[28] Die zwanzig natürlichen Aminosäuren bedingen eine erhebliche chemische Diversität, doch ist diese klein im Vergleich zu dem, was die posttranslationalen Modifikationen bereithal-

[*] T. Ly, Prof. R. R. Julian
Department of Chemistry, University of California
Riverside, CA 92521 (USA)
E-Mail: ryan.julian@ucr.edu
Homepage: <http://faculty.ucr.edu/~ryanj/>

ten. (Es gibt über 200 bekannte Modifikationen, die nicht aus dem Genom abgeleitet werden können.^[29]) Wenn man all diese Isoformen berücksichtigt, ist die Zahl der Moleküle, die betrachtet werden müssen, atemberaubend. Die schiere Menge verlangt nach einer Methode, die sich in ein Hochdurchsatz-Format überführen lässt. Wenn man dies alles berücksichtigt, erscheint eine einzelne Technik oder Methode nicht mehr ausreichend. Aktuelle Entwicklungen in der Massenspektrometrie, in Kombination mit der Dissoziation durch hochenergetische Photonen, haben die neuen Lösungsansätze für verschiedene Probleme der Proteomanalyse ermöglicht, die im Folgenden beschrieben werden.

2. Implementierung der Photodissoziation

Einfach ausgedrückt erfordert die Photodissoziations-Massenspektrometrie (PD-MS), dass Ionen und Photonen zur selben Zeit am selben Ort sind, damit die Ionen das Licht absorbieren können. Diese Voraussetzung lässt sich am leichtesten mithilfe von „Fallen“ erfüllen, in denen die Ionen für eine gewisse Zeit an einem bestimmten Ort gespeichert werden. Dadurch wird die zeitliche Abstimmung des Laserpulses wesentlich erleichtert. Lineare Ionenfallen- und Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometer sind besonders gut für Photodissoziationsversuche geeignet, da ihr geometrischer Aufbau die Einkopplung eines Laserpulses erleichtert (Abbildung 1). Für die PD können diesen Instrumente einfach mit einem Quarzfenster versehen werden, ohne das Massenspektrometer selbst abzuwandeln. Auch der Einsatz von 3D-Quadrupol-Ionenfallen ist möglich; dann sind allerdings Zugangsöffnungen erforderlich. Diese werden meist durch die Ringelektrode der Ionenfalle selbst gebohrt. Auch Ionen, die nicht eingefangen werden, lassen sich dissoziieren, doch sind die Anforderungen an die zeitliche Steuerung eines solchen Experiments höher, weil die Laser exakt in dem Moment feuern müssen, in dem die Ionen die zugängliche Region passieren. Außerdem müssen die Ionen genügend komprimiert werden, damit es zwischen der gesamten Ionenpopulation und dem Laserpuls zu einer ausreichenden Überlappung kommt.

Wellenlängen und Leistung unterscheiden sich für die einzelnen Laser (Tabelle 1). Meist wird Licht der Wellenlängen 157, 193, 266 oder 355 nm genutzt. Licht der Wellenlänge 157 nm muss über ein Vakuum zwischen Laser und Massenspektrometer eingekoppelt werden, um eine Absorption

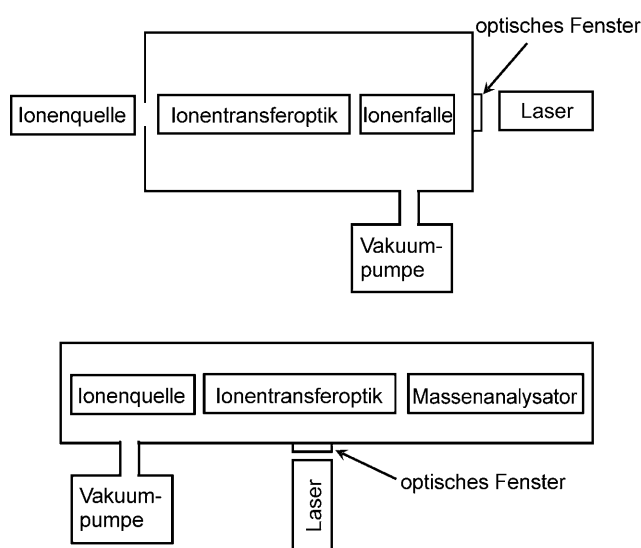


Abbildung 1. Allgemeiner Aufbau von Ionenfallen- und „on the fly“-Photodissoziationsexperimenten.

Tabelle 1: Energien einiger wichtiger UV-Laser.

Laser	λ [nm]	E [kJ mol ⁻¹]	E [eV]
F ₂ -Excimer	157	762	7.9
ArF-Excimer	193	620	6.4
Nd:YAG (frequenzvervielfacht)	266	450	4.7
Nd:YAG (frequenzverdreifacht)	355	337	3.5

durch die Luft zu vermeiden. Ein weiterer Parameter bei vielen Geräten mit Ionenfalle ist der Zeitraum, der benötigt wird, um die Falle zu füllen. Viele Geräte haben eine automatische Rückkopplungskontrolle, die die Sammelzeit so variiert, dass eine ideale Zahl an Ionen eingefangen wird, unabhängig davon, wie der Ionenstrom von der Quelle schwankt. Dadurch kann sich die Zeit zum Auffüllen der Falle laufend ändern. Im Idealfall sollte der Laser für die PD diskontinuierlich feuern, wobei die Wiederholungsrate an die Sammelzeit der Ionenfalle angepasst ist. Die meisten Neodym-dotierten Yttrium-Aluminium-Granat-Laser (Nd:YAG-Laser) arbeiten unter diesen Bedingungen nicht besonders gut; bei den in letzter Zeit entwickelten Lasern gibt es allerdings Ausnahmen.



Ryan Julian erhielt seinen BS in Chemie von der University of Utah im Jahr 1999. Er schloss seine Promotion 2003 am Caltech bei Jack Beauchamp ab und wechselte dann als Postdoktorand zu Martin Jarrold und David Clemmer an die Indiana University. Seit 2005 forscht er als Assistant Professor an der University of California in Riverside über biologische Massenspektrometrie.



Tony Ly wurde in Alexandria, Virginia, USA geboren. 2005 erhielt er den BS in Chemie vom College of William and Mary. Gegenwärtig arbeitet er an seiner Dissertation über Radikalchemie in der Gasphase und biologische Massenspektrometrie bei Professor Ryan Julian an der University of California in Riverside.

Neben der Ausrüstung erfordert die PD im UV-Bereich auch einen passenden Chromophor im Ion. Versuche bei 193 nm, und vor allem bei 157 nm, vermeiden diese Einschränkung wegen der zahlreichen Absorptionslinien in diesem Wellenlängenbereich. Bei 266 nm zeigen nur Tryptophan und Tyrosin eine gewisse Absorption. Peptide, die diese Reste nicht enthalten, absorbieren nicht nennenswert. Praktisch keine Absorption gibt es ohne einen zusätzlichen Chromophor bei 355 nm. Jedes der beiden spektralen Fenster bietet seine Vorteile: Bei kürzeren Wellenlängen werden künstliche Chromophore überflüssig; bei längeren Wellenlängen dagegen werden Versuche möglich, bei denen Ort und Art der Energieabgabe genau einstellbar sind. Mögliche Fragmentierungsprozesse, die hier diskutiert werden, sind in Abbildung 2 skizziert.

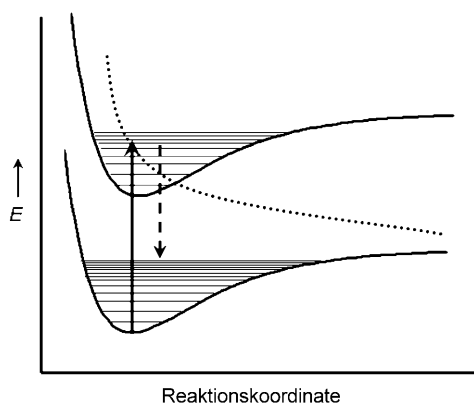


Abbildung 2. Vereinfachte Darstellung der Energieabsorption und der Fragmentierungswege bei der PD. Die Absorption (durchgezogene Linie) der Energie eines Photons führt zur Anregung in einen höheren elektronischen Zustand. Die Kopplung an einen antibindenden Zustand (gepunktete Linie) verursacht die sofortige Dissoziation. Ansonsten kommt es zur statistischen Umverteilung der Energie auf verschiedene Schwingungsmoden. Dieser Vorgang kann einer unimolekularen Dissoziation im elektronischen Grundzustand vorausgehen.

3. Anwendungen in der Proteomanalyse

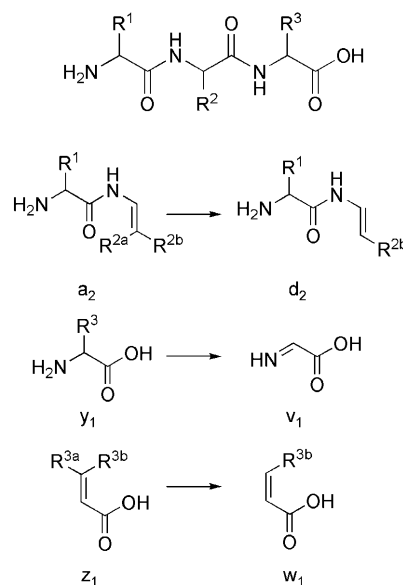
Wie im ersten Abschnitt bereits erwähnt wurde, hält die Proteomforschung viele experimentelle Herausforderungen bereit. UV-PD bietet gegenüber anderen Fragmentierungstechniken verschiedene Vorteile: Beispielsweise wird die Energie um Größenordnungen schneller übertragen. Sogar niederenergetische PD-Methoden wie Infrarot-Multiphotonendissoziation (IRMPD) benötigen meist nur Millisekunden,^[24,30] und UV-PD spielt sich im Nano- bis Mikrosekundenbereich ab. Direkte Dissoziationen sind viel schneller. Die hohe Geschwindigkeit ist immer dann von Vorteil, wenn eine Methode an eine Hochdurchsatz-Anwendung angepasst wird, weil mehr Daten in kürzerer Zeit erfasst werden können. In einem Gerät mit Ionenfalle könnten etwa während einer einstündigen Flüssigchromatographie zusätzlich 1800 Peaks untersucht werden. Eine solche Geschwindigkeit bringt in manchen instrumentellen Konfigurationen noch zusätzliche Vorteile, so zum Beispiel bei TOF-TOF-MS, wo die Zeit für

die Fragmentierung einen größeren Anteil der Gesamtzeit für einen Durchlauf ausmacht. Die Effizienz lässt sich in diesem Fall um eine Größenordnung oder mehr steigern. Ein weiterer Vorteil bei manchen UV-PD-Experimenten ist der gezielte Energieeintrag. Man kann die Spezifität der Photon-Chromophor-Wechselwirkung nutzen, um den Ort und Betrag der auf das Molekül übertragenen Energie vorzugeben. Dies ermöglicht gezielte Dissoziationsexperimente, die mit anderen Methoden nicht gelingen.

3.1. Alternative Sequenzierungsverfahren

3.1.1. Direkte Absorption durch Bindungen

Kurzwellige Laser können das Peptidrückgrat direkt anregen, wodurch geeignete Seitenketten oder angehängte Chromophore überflüssig werden.^[31–35] Die Fragmentierung kann dann nach mindestens zwei Mechanismen verlaufen. Beim ersten wird die Energie intern in Schwingungszustände umgewandelt, aus denen heraus eine Fragmentierung in den elektronischen Grundzustand stattfindet. Die so erzielte Fragmentierung sollte derjenigen ähneln, die sich bei stoß-induzierter Dissoziation (collision-induced dissociation, CID), IRMPD oder anderen statistischen Dissoziationsverfahren ergibt. Interessanterweise erhält man bei PD mit kurzwelligen Lasern ein anderes Fragmentierungsmuster, und viele Fragmente, die man findet, werden durch CID normalerweise nicht gebildet. Insbesondere werden viele x- oder a-Ionen gebildet, je nachdem, wo die Ladung im Peptid lokalisiert ist. Relevante Strukturen und die Standardnomenklatur sind in Schema 1 zusammengestellt.^[36,37] Reilly und Mitarbeiter führten diese nichtstatistischen Produkte auf eine direkte oder schnelle Dissoziation im angeregten Zustand zurück. Zunächst vermutete man, dass diese Dissoziation nur bei 157 nm abläuft,^[38] doch in anderen Versuchen bei 193 nm entstand ein ähnliches Fragmentmuster.^[34,19] Das Zeitfenster



Schema 1. Standardnomenklatur der Fragmentierungen und zugehörige Strukturen.^[36,37]

für die Beobachtung ist in diesen Experimenten entscheidend. Die charakteristische Fragmentierung dominiert in den ersten Mikrosekunden, während das Fragmentmuster nach einigen Millisekunden mehr demjenigen der CID ähnelt. Die v-, w- und d-Ionen, die in diesen Versuchen auftauchen, lassen auch Rückschlüsse auf die Seitenketten zu. Wegen des Verlusts der Seitenkette, der so bei der CID oder anderen statistischen Fragmentierungsverfahren nicht vorkommt, kann PD einfach zwischen Leucin und Isoleucin unterscheiden (Abbildung 3). Insgesamt liefert UV-PD nützliche Sequenzinformationen, die Ergebnisse aus anderen Verfahren ergänzen. Dieser Ansatz wurde kürzlich ausführlich dargestellt.^[39]

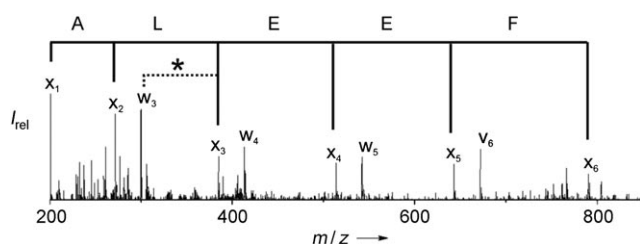


Abbildung 3. Ein PD-Spektrum, aufgenommen bei 157 nm, zeigt die vollständige Sequenzabdeckung durch die x-Ionenserie. Leucin lässt sich von der isobaren Aminosäure Isoleucin durch die charakteristische Massenverschiebung zwischen x_3 und w_3 (*) unterscheiden. Verändert nach Lit. [31] und mit freundlicher Genehmigung abgedruckt.

3.1.2. Nichtkovalentes Anbringen von Chromophoren

Photonen mit Wellenlängen über 193 nm werden von Peptiden und Proteinen nur schwach absorbiert, weil ihnen Chromophore für diese Wellenlängen weitgehend fehlen. Dieses Problem lässt sich zwar durch kovalente Kupplung mit geeigneten Chromophoren beheben, doch ist dieser Ansatz wegen der zusätzlichen chemischen Umsetzungen oft unpraktisch. Eine Alternative stellt das Anbringen eines Chromophors über nichtkovalente Wechselwirkungen dar. In diesem Fall muss man nur die entsprechenden Verbindungen vor der Analyse zur Probenlösung geben. Zwei Beispiele für solche Verbindungen finden sich in Abbildung 4. Dieses Experiment widerspricht der Intuition, denn einerseits muss Energie vom Chromophor adsorbiert, in Schwingungsenergie umgewandelt und dann auf das Biomolekül übertragen werden, bevor die nichtkovalente Einheit zerbricht. Andererseits muss die übertragene Energie aber ausreichen, um kovalente Bindungen zu brechen. Und doch konnte die Effizienz dieser Strategie von zwei Arbeitsgruppen anhand von unterschiedlichen Verbindungen gezeigt werden.^[40,41] Als Beispiel ist in Abbildung 4c ein Spektrum mit umfangreicher Fragmentierung gezeigt. Ein Schlüsselement ist eine vielzählige nichtkovalente Wechselwirkung; dadurch ist die Wahrscheinlichkeit der gleichzeitigen Anregung aller nichtkovalenten Bindungen vor einer nennenswerten Energieübertragung verringert.

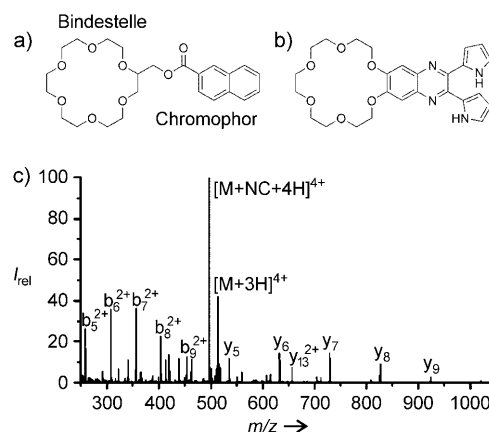


Abbildung 4. Die nichtkovalente Anbindung eines UV-Chromophors, z. B. über a) Naphthoyl-[18]Krone-6-Ether (NC) oder b) [18]Krone-6-dipyrrolylchinoxalin, erleichtert die schnelle Übertragung von Energie auf das Peptid. c) Das Fragmentierungsmuster ist identisch mit demjenigen nach stoßinduzierter Dissoziation, die UV-PD läuft allerdings viel schneller ab. Verändert nach Lit. [40] und [41] und mit freundlicher Genehmigung abgedruckt.

3.1.3. Femtosekunden-Fragmentierung

Aktuelle Untersuchungen mit einem Titan-Saphir-Femtosekundenlaser bei 800 nm sind in diesem Zusammenhang ebenfalls von Interesse.^[42] Diese Wellenlänge liegt zwar nicht im UV-Bereich, doch das in den Experimenten beobachtete Fragmentierungsverhalten ähnelte viel mehr demjenigen bei UV-PD^[23] als bei IRMPD. Da außerdem keine Peptid-Chromophore in diesem Spektralbereich absorbieren, findet wahrscheinlich eine nichtlineare Absorption statt. Aus Gründen der Energetik müssen zudem mehrere Photonen absorbiert werden. In diesen Versuchen werden beträchtliche Mengen an direkt beobachtbarem photoionisiertem Peptid und davon abgeleiteten Fragmenten erzeugt (Abbildung 5). Dem photoionisierten Peptid fehlt Wasserstoff; es hat die gleiche Masse wie die Peptidradikale, die in Abschnitt 3.3 diskutiert werden. Es ist nicht überraschend, dass viele der in diesen Versuchen beobachteten Produkte ebenfalls denen ähneln, die in Abschnitt 3.3 beschrieben werden. Auch andere Fragmente, ähnlich denen, die durch kurzweilige UV-PD erzeugt wurden (siehe Abschnitt 3.1.1), wurden beobachtet

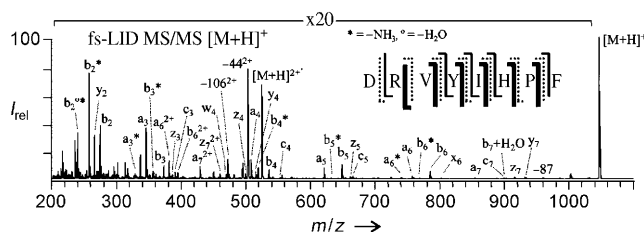


Abbildung 5. Massenspektrum von Angiotensin II nach Femtosekundenlaser-induzierter Dissoziation bei 800 nm (fs-LID MS/MS). Die Fragmentierung des Peptidrückgrats stimmt mit der Dissoziation von $[M+H]^{2+}$ und anderen hochenergetischen Fragmentierungsprozessen überein. Verändert nach Lit. [42] und mit freundlicher Genehmigung abgedruckt.

(so die w- und a-Ionen). Vermutlich laufen bei diesen Experimenten mehrere verschiedene Prozesse ab. Um die exakten Mechanismen zu verstehen, sind zwar noch weitere Daten erforderlich, es steht jedoch schon fest, dass mithilfe von kurzen Pulsen mit hoher Intensität die Fragmentierung aufgeklärt werden kann, wie dies in früheren Versuchen mit Femtosekundenpulsen gelang.^[23]

3.2. Selektive Fragmentierung

3.2.1. Angehängte Chromophore als Opfersubstrate

Ein Vorteil der UV-PD ist, dass bei gewissen Wellenlängen passende Chromophore fehlen. So ist die Absorption durch native Peptide und Proteine bei 355 nm minimal. Wilson und Brodbelt nutzten dies, um die Fragmentierung in modifizierten Peptiden zu steuern.^[43] Dazu wurde ein Peptid mit einem Chromophor derivatisiert, der bei 355 nm absorbiert. Die interne Umwandlung der ursprünglichen photonischen Anregungsenergie in Schwingungsenergie führte zur Fragmentierung des Peptids. Entscheidend bei diesen Experimenten war, dass Fragmente, die den Chromophor nicht enthielten, keine weitere Energie absorbieren und daher leicht nachgewiesen werden konnten. Die Fragmente, die den Chromophor enthielten, absorbierten dagegen weiterhin Photonen und wurden entsprechend weiter fragmentiert – bis zu dem Punkt, an dem sie nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Auf diese Art wird eine Serie von Ionen erzeugt, die von dem vom Chromophor entfernten Molekülende stammt und die einfach ausgewertet werden kann, ohne dass komplizierte komplementäre Paare dies erschweren (Abbildung 6). Durch die selektive Fragmentierung lassen sich somit unerwünschte Ionen eliminieren. Dies ist nur aufgrund der hohen Spezifität der Photon-Chromophor-Wechselwirkung möglich. Ähnliche Ergebnisse wurden bei 266 nm beobachtet, obwohl in diesem Fall die Absorption durch native Chromophore stören kann.^[44]

3.2.2. Spaltung von Disulfidbrücken

Disulfidbrücken sind von entscheidender Bedeutung für Struktur und Stabilität von Proteinen und Peptiden, bei der Massenspektrometrie sind sie allerdings ausgesprochen störend. Sie bilden innerhalb der Proteine cyclische Elemente und komplizieren dadurch die Sequenzanalyse. Die übliche Methode, um dieses Problem zu lösen, sieht vor, alle Disulfidbrücken durch Reduktion und Alkylierung zu entfernen. Dies erfordert jedoch einen weiteren chemischen Schritt in Lösung, und es besteht die Gefahr einer unvollständigen Alkylierung. Zubarev und Mitarbeiter leiteten mit UV-Licht bei 157 nm die selektive Spaltung der Disulfidbrücken ein, da diese bei der verwendeten Wellenlänge stark absorbieren.^[45] Gebrochen werden intra- und intermolekulare Disulfidbrücken. Diese Fragmentierung ergibt meist die größten Peaks im Spektrum. Das Verfahren erfordert auch viel weniger Zeit als Ansätze in Lösung. Die wichtigste Einschränkung ist, dass wegen der Absorption durch das Peptidrückgrat weitere Fragmente entstehen, was die Empfindlichkeit vor allem bei größeren Systemen begrenzt. Kleine Moleküle kann man mit

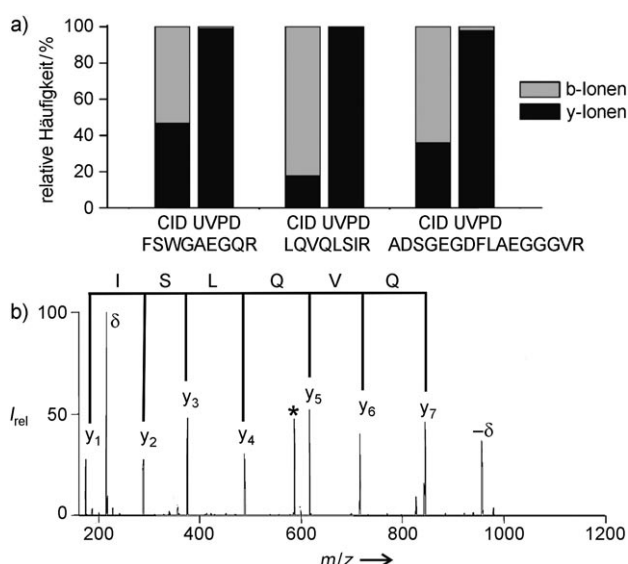


Abbildung 6. UV-PD (bei 355 nm) von Peptiden, die zuvor kovalent am N-Terminus mit einem UV-absorbierenden Chromophor markiert wurden, führt selektiv zum Zerfall der b-Ionen. a) Für drei repräsentative Peptide ist der Vergleich von Fragmentationen gezeigt, die durch CID und UV-PD erzeugt wurden. b) UV-PD des modifizierten Peptids LQVQLSIR. Wenn nur eine Fragmentationart vorliegt, ist eine De-novo-Sequenzierung möglich. Verändert nach Lit. [43] und mit freundlicher Genehmigung abgedruckt. δ = 7-Amino-4-methylcumarin-3-essigsäure; * Vorläuferion.

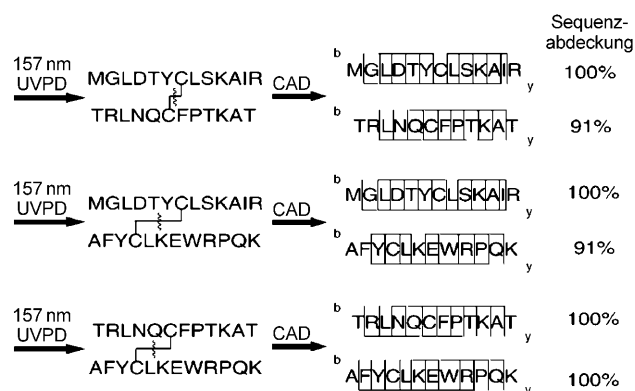


Abbildung 7. Disulfidbrücken verringern die Fragmentierungseffizienz und werden daher vor der MS-Analyse meist reduziert. Durch UV-PD lassen sich Disulfidbrücken selektiv spalten. Mit einer Kombination von UV-PD und stoßaktivierter Dissoziation (CAD) ließ sich bei drei Peptiden mit Disulfidbrücken fast die gesamte Sequenz aufklären. Verändert nach Lit. [45] und abgedruckt mit freundlicher Genehmigung.

diesem Verfahren jedoch effizient fragmentieren und sequenzieren (Abbildung 7).

3.3. Initiation durch Radikale

Besondere Aufmerksamkeit haben Methoden erfahren, bei denen Elektronen zur Fragmentierung verwendet werden, vor allem Elektroneneinfang-Dissoziation (electron-capture dissociation, ECD)^[46] und Elektronentransfer-Dissoziation

(ETD).^[47] Obwohl die exakten Mechanismen bei der Fragmentierung durch diese Methoden noch untersucht werden,^[48,49] steht fest, dass Radikale beteiligt sind, denn in beiden Fällen werden Verbindungen mit ungerader Elektronenzahl erzeugt. Selektivitätsprobleme entstehen bei der Erzeugung von Radikalen mithilfe von Elektronen daraus, dass weder das Elektron noch die beim Einfang freigesetzte Energie auf eine bestimmte Bindung gerichtet werden können. Aus diesen und anderen Gründen wurde nach alternativen Verfahren für die Radikalerzeugung gesucht.^[50,51] Mit UV-PD lassen sich Peptid- oder Proteinradikale in guter Ausbeute und präzise kontrollierbar erhalten.

Die photochemischen Prozesse bei der Radikalerzeugung mit PD unterscheiden sich grundlegend von denjenigen bei Standard-UV-PD-Experimenten. Zum Beispiel sind C-I- und C-S-Bindungen nach Absorption eines UV-Photons einer direkten Fragmentierung zugänglich.^[52,53] Bei der homolytischen Spaltung im angeregten Zustand entstehen sofort Radikale (gepunktete Linie in Abbildung 2). Iodverbindungen können UV-Licht zwar direkt absorbieren, doch wird die Effizienz der Fragmentierung von C-I- und C-S-Bindungen durch direkte Kupplung an einen geeigneten Chromophor deutlich gesteigert. Die Energie, die vom Chromophor absorbiert wird, wird effizient in den dissoziativen Zustand eingekoppelt. Auf diese Weise kann Energie wirksam auf eine bestimmte Stelle übertragen werden, um dort das Radikal zu bilden. C-I-Bindungen können einfach durch Iodierung von Tyrosin in Proteine und Peptide eingeführt werden, und C-S-Bindungen lassen sich an Cystein- oder phosphorylierten Serin- oder Threoninresten einbauen. Beide Methoden werden im Folgenden beschrieben.

3.3.1. Das ganze Proteinmolekül als Radikal

Die Iodierung von Proteinen und Peptiden in Lösung erfolgt bevorzugt an Tyrosinresten und ist in ganzen Proteinmolekülen weitgehend selektiv für die am stärksten exponierten Reste.^[54] Unter sorgfältig kontrollierten Reaktionsbedingungen können überwiegend einfach iodidierte Proteine erhalten werden, bei denen sich der Iodsubstituent bevorzugt an einem einzelnen Tyrosinrest befindet. Bei anschließender Aktivierung mit Photonen der Wellenlänge 266 nm entsteht in guter Ausbeute ein Radikal an diesem Tyrosinrest (Abbildung 8a,b).^[55] Die Stoßaktivierung dieser radikalischen Verbindung führt zur Fragmentierung hauptsächlich in der Nachbarschaft des Radikals (Abbildung 8a,c). Die Fragmentierung am Tyrosinrest und an benachbarten Prolinresten fand besonders häufig statt. Eine dermaßen gesteuerte, selektive Fragmentierung eines ganzen Proteins konnte zuvor noch nicht beobachtet werden. Außerdem ließ sich zeigen, dass die Analysedauer für Proteomdaten um mehrere Größenordnungen verkürzt werden kann, wenn die Fragmentierungspositionen vorgegeben und die Zahl der Fragmente auf diese Weise eingeschränkt werden können. Die Effizienz wird verbessert, denn der Informationsgehalt der Daten nimmt zu, wenn die Ergebnisse vorhersagbar sind. Dieser Ansatz wurde zwar noch nicht in einem Hochdurchsatz-Versuch getestet, er verspricht jedoch erhebliche Vorteile gegenüber gängigen Methoden.

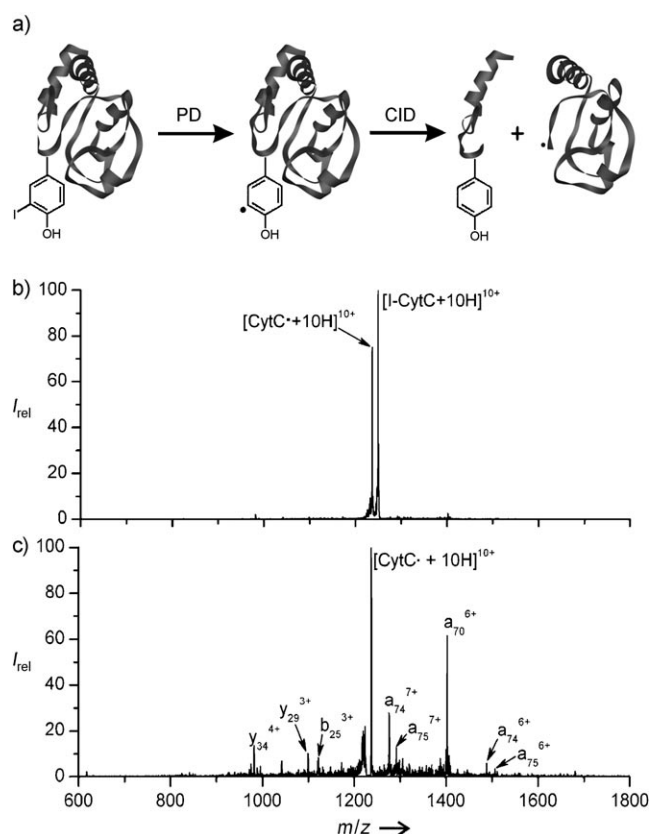


Abbildung 8. a) Das Konzept der selektiven Fragmentierung in einem ganzen Protein. b) UV-PD iodmarkierter Proteine erzeugt spezifisch ein Radikal an der Stelle der Tyrosin-Seitenkette. c) CID des Radikals führt zu einer Fragmentierung des Peptidrückgrats in der Nähe des modifizierten Tyrosinrests (Tyr74). CytC = Cytochrom c.

3.3.2. Identifizierung von Phosphorylierungen

Die Identifizierung posttranslationaler Modifikationen (PTMs) bleibt eine wichtige Aufgabe bei allen Proteomuntersuchungen.^[29] Auch wenn PTMs in einem Versuch nicht spezifisch untersucht werden, müssen sie stets in Betracht gezogen werden, weil sie die Auswertung der Daten komplizieren können. Wie zuvor gezeigt wurde, kann die spezifische Photon-Chromophor-Wechselwirkung eine gezielte Energieübertragung ermöglichen, wie sie mit anderen Fragmentierungsverfahren nicht möglich ist. Bezüglich der PTMs bietet die Phosphorylierung an Threonin- und Serinresten einen ausgezeichneten Ansatzpunkt für die spezifische Derivatisierung.^[56] Indem man das Phosphat eliminiert und einen Chromophor mit einer C-S-Bindung einführt, kann man genau an dieser Stelle photochemisch ein Radikal zur Fragmentierung des Peptidrückgrats erzeugen. Die Photoaktivierung des modifizierten Peptids führt also gezielt zu einem Bindungsbruch am Ort der Modifikation.^[57] Dieser Ansatz vereinfacht nicht nur die Datenauswertung, sondern er erhöht auch die Empfindlichkeit enorm, weil deutlich weniger Peaks beobachtet werden. Bei einem Peptid mit 20 Aminosäureresten würde man beispielsweise mit ECD/ETD etwa 40 Fragmente erwarten, während das PD-Experiment nur zwei oder drei Fragmente liefert. Spektren von Proben, die diesen

Unterschied verdeutlichen, sind für ein kleineres Peptid in Abbildung 9 gezeigt. Die relevante Information in Abbildung 9b ist im größten Peak des Spektrums enthalten, und beinahe die gesamte Fragmentintensität identifiziert die Phosphorylierungsstelle. Die UV-PD in der Gasphase ist daher um fast eine Größenordnung empfindlicher als gewöhnliche Ansätze. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Identifizierung der Phosphorylierungsstelle mit dieser Methode viel verlässlicher ist als mit der länger genutzten CID-Methode.

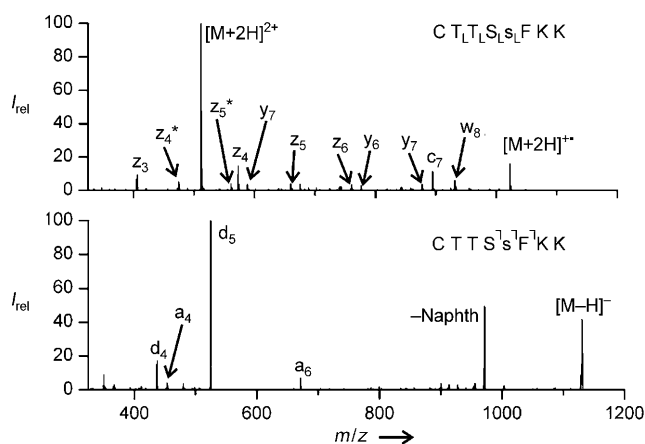


Abbildung 9. ECD (oben) und radikalgesteuerte Dissoziation (RDD, unten); die Spektren des Phosphopeptids CTTsFKK zeigen, dass mit beiden Verfahren die Phosphorylierungsstelle korrekt identifiziert werden kann. RDD ist dabei überlegen hinsichtlich der Fragmentierungseffizienz (Ausbeute und Selektivität), was bei Phosphopeptiden in niedrigen Konzentrationen wichtig wird. Das untere Spektrum wurde verändert aus Lit. [57] mit freundlicher Genehmigung übernommen. * Abspaltung von H_3PO_4 .

Mit einem völlig anderen Ansatz konnten Dugourd und Mitarbeiter zeigen, dass man mit UV-PD auch Radikalanionen erzeugen kann.^[58] In ihren Experimenten wurde durch Laserbestrahlung eines dianionischen Phosphopeptids mit Licht der Wellenlänge 262 nm ein Elektron abgespalten. Die anschließende Stoßaktivierung des anionischen Radikalpeptids ergab eine Serie von a- und x-Fragmenten und Verluste von Seitenketten einschließlich dem Verlust der labilen Phosphatgruppe (Abbildung 10). Die Phosphatgruppe blieb allerdings meist an den Fragmenten des Peptidrückgrats gebunden, wodurch sich die Phosphorylierungsposition festlegen ließ. Obwohl dieser Ansatz unspezifisch ist, scheint die Einführung des Radikals die Schwelle für die Fragmentierung des Rückgrats zu senken, sodass sie energetisch mit dem Verlust der Phosphatgruppe vergleichbar ist.

3.3.3. Nichtkovalente Radikalerzeugung

Im Idealfall sollte die Erzeugung radikalischer Peptide ohne vorherige Derivatisierung in Lösung ablaufen. Ein ähnlicher Ansatz wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben kann auch zur Erzeugung radikalischer Peptide und Proteine die-

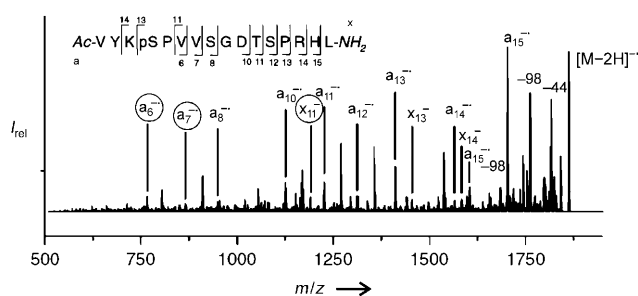


Abbildung 10. UV-PD eines dreifach geladenen Phosphopeptidanions löst ein Elektron ab und erzeugt ein doppelt geladenes Radikal. Bei der anschließenden Stoßaktivierung wird das Peptidrückgrat fragmentiert, wobei die Phosphatgruppe erhalten bleibt. Die Fragmente ermöglichen daher die Identifizierung der Phosphorylierungsstelle. Schlüsselfragmente, mit deren Hilfe man Ser4 als Phosphorylierungsstelle festlegen kann, sind eingekreist. Verändert nach Lit. [58] und mit freundlicher Genehmigung abgedruckt.

nen, allerdings nur in Kombination mit PD.^[59] Eine photolabile Radikalvorstufe wie die Iodnaphthyl-Gruppe wird an einen nichtkovalenten Überträger wie [18]Krone-6 gekuppelt. Nach der Photoaktivierung kann der Radikalcharakter durch Wasserstoffatomtransfer auf das komplexierte Peptid übertragen werden. Bei der anschließenden Stoßaktivierung wird der Radikalüberträger entfernt, und das Peptidradikal bleibt zurück. Ähnliche Versuche, diese Methode mit der CID-Aktivierung der ursprünglichen Radikalvorstufe zu kombinieren, scheiterten. In diesem Fall wurde das Radikal statistisch erzeugt, wobei die nichtkovalenten Bindungen meist vor der Bildung des Radikals brachen. Ein interessantes Ergebnis, das sich bei der Untersuchung einer Gruppe solcher Peptidradikale mit Wasserstoffmangel ergab, ist, dass solche Moleküle nach Fragmentierung des Rückgrats an Stellen mit verstärkter β -Radikal-Stabilität bevorzugt a-Ionen bilden (Abbildung 11). Vor allem aromatische Reste einschließlich Histidin sind bevorzugte Stellen für eine derartige Fragmentierung. Das verstärkte Vorkommen dieser Ionen in anderen PD-Experimenten kann auf die Rolle der Photoionisation bei der Erzeugung von Wasserstoffmangel-Radikalen hinweisen.

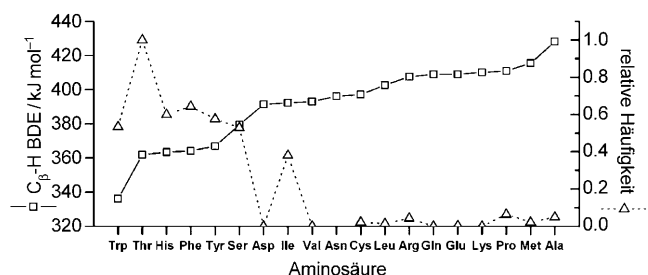


Abbildung 11. Ein Vergleich der berechneten Dissoziationsenergien von $\text{C}_\beta\text{-H}$ -Bindungen (Quadrate) mit radikalinduzierten Fragmentierungen des Peptidrückgrats (Dreiecke) ergibt, dass die stärkere Fragmentierung des Rückgrats mit einer niedrigeren Dissoziationsenergie der $\text{C}_\beta\text{-H}$ -Bindung (BDE) korreliert. Die radikalinduzierte Dissoziation des Rückgrats erfolgt am häufigsten bei Resten mit aromatischen oder aliphatischen Seitenketten.

4. Ausblick

Technische Fortschritte bei Massenspektrometrie und Lasern werden der Forschung auch weiterhin neue Wege eröffnen. Besonders lineare Ionenfallen, die preisgünstig und gut geeignet zur Kopplung mit Lasern sind, sind für die weitere Entwicklung in diesem Bereich vielversprechend. Das Ausmaß an Kontrolle und die Geschwindigkeit, die durch UV-PD erreicht wurden, haben einzigartige neue Versuchsanordnungen ermöglicht, und wahrscheinlich werden weitere Experimente auf dieser Grundlage entwickelt werden.

Unsere Arbeiten wurden von der NSF unter dem Aktenzeichen CHE-0747481 gefördert.

Eingegangen am 2. Februar 2009,
veränderte Fassung am 10. März 2009
Online veröffentlicht am 16. Juli 2009
Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] S. Kim, R. P. Rodgers, A. G. Marshall, *Int. J. Mass Spectrom.* **2006**, *251*, 260–265.
- [2] M. E. Belov, M. V. Gorshkov, H. R. Udseth, G. A. Anderson, R. D. Smith, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2271–2279.
- [3] A. Wolf-Yadlin, S. Hautaniemi, D. A. Lauffenburger, F. M. White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 5860–5865.
- [4] M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299–2301.
- [5] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **1989**, *246*, 64–71.
- [6] A. Pandey, M. Mann, *Nature* **2000**, *405*, 837–846.
- [7] S. A. Hofstadler, K. A. Sannes-Lowery, J. C. Hannis, *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 265–285.
- [8] V. H. Wysocki, K. A. Resing, Q. F. Zhang, G. L. Cheng, *Methods* **2005**, *35*, 211–222.
- [9] C. M. Jones, R. L. Beardsley, A. S. Galhena, S. Dagan, G. Cheng, V. H. Wysocki, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15044–15045.
- [10] T. Ly, R. R. Julian, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17*, 1209–1215.
- [11] M. K. Green, C. B. Lebrilla, *Mass Spectrom. Rev.* **1997**, *16*, 53–71.
- [12] D. Suckau, Y. Shi, S. C. Beu, M. W. Senko, J. P. Quinn, F. M. Wampler, F. W. McLafferty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 790–793.
- [13] I. A. Kaltashov, S. J. Eyles, *Mass Spectrom. Rev.* **2002**, *21*, 37–71.
- [14] R. T. Kurugugama, S. J. Valentine, R. A. Sowell, D. E. Clemmer, *J. Proteomics* **2008**, *71*, 318–331.
- [15] R. Guevremont, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1058*, 3–19.
- [16] T. Wyttenbach, G. von Helden, M. T. Bowers, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8355–8364.
- [17] E. H. Seeley, R. M. Caprioli, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 18126–18131.
- [18] J. Steill, J. F. Zhao, C. K. Siu, Y. Y. Ke, U. H. Verkerk, J. Oomens, R. C. Dunbar, A. C. Hopkinson, K. W. M. Siu, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9812–9814; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9666–9668.
- [19] W. D. Bowers, S. S. Delbert, R. L. Hunter, R. T. McIver, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7288–7289.
- [20] E. R. Williams, J. J. P. Furlong, F. W. McLafferty, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1990**, *1*, 288–294.
- [21] D. F. Hunt, J. Shabanowitz, J. R. Yates III, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 548–550.
- [22] R. Weinkauff, P. Schanen, A. Metsala, E. W. Schlag, M. Burgle, H. Kessler, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 18567–18585.
- [23] R. Weinkauff, P. Aicher, G. Wesley, J. Grotemeyer, E. W. Schlag, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 8381–8391.
- [24] J. Laskin, J. H. Futrell, *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 135–167.
- [25] S. E. Ong, M. Mann, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 252–262.
- [26] B. Dorn, R. Aebersold, *Science* **2006**, *312*, 212–217.
- [27] R. Aebersold, D. R. Goodlett, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 269–295.
- [28] L. Guerrier, P. G. Righetti, E. Boschetti, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 883–890.
- [29] R. E. Schweppe, C. E. Haydon, T. S. Lewis, K. A. Resing, N. G. Ahn, *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 453–461.
- [30] D. M. Black, A. H. Payne, G. L. Glish, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17*, 932–938.
- [31] M. S. Thompson, W. D. Cui, J. P. Reilly, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4895–4898; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4791–4794.
- [32] T. Y. Kim, M. S. Thompson, J. P. Reilly, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 1657–1665.
- [33] M. S. Thompson, W. D. Cui, J. P. Reilly, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 1439–1452.
- [34] J. H. Moon, S. H. Yoon, M. S. Kim, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 3248–3252.
- [35] K. M. Choi, S. H. Yoon, M. L. Sun, J. Y. Oh, J. H. Moon, M. S. Kim, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17*, 1643–1653.
- [36] P. Roepstorff, J. Fohlman, *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**, *11*, 601.
- [37] R. S. Johnson, S. A. Martin, K. Biemann, J. T. Stults, J. T. Watson, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2621–2625.
- [38] W. D. Cui, M. S. Thompson, J. P. Reilly, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 1384–1398.
- [39] J. P. Reilly, *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, DOI: 10.1002/mas.20214.
- [40] J. J. Wilson, G. J. Kirkovits, J. L. Sessler, J. S. Brodbelt, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 257–260.
- [41] G. K. Yeh, Q. Sun, C. Meneses, R. R. Julian, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 385–393.
- [42] C. L. Kalcic, T. C. Gunaratne, A. D. Jones, M. Dantus, G. E. Reid, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 940–942.
- [43] J. J. Wilson, J. S. Brodbelt, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7883–7892.
- [44] J. Y. Oh, J. H. Moon, Y. H. Lee, S. W. Hyung, S. W. Lee, M. S. Kim, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 1283–1288.
- [45] Y. M. E. Fung, F. Kjeldsen, O. A. Silivra, T. W. D. Chan, R. A. Zubarev, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6557–6561; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6399–6403.
- [46] 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.
- [47] J. E. P. Syka, J. J. Coon, M. J. Schroeder, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9528–9533.
- [48] M. Sobczyk, J. Simons, *Int. J. Mass Spectrom.* **2006**, *253*, 274–280.
- [49] E. A. Syrtad, F. Turecek, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 208–224.
- [50] I. K. Chu, C. F. Rodriguez, T. C. Lau, A. C. Hopkinson, K. W. M. Siu, *J. Chem. Phys. B* **2000**, *104*, 3393–3397.
- [51] S. Wee, R. A. J. O'Hair, W. D. McFadyen, *Int. J. Mass Spectrom.* **2004**, *234*, 101–122.
- [52] K. K. Thoen, J. Perez, J. J. Ferra, Jr., H. I. Kenttämä, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 1135–1140.
- [53] M. F. Lin, Y. A. Dyakov, Y. T. Lee, S. H. Lin, A. M. Mebel, C. K. Ni, *J. Chem. Phys.* **2007**, *127*, 064308.
- [54] E. B. McGowan, E. Stellwag, *Biochemistry* **1970**, *9*, 3047–3053.
- [55] T. Ly, R. R. Julian, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 351–358.
- [56] C. Klemm, S. Schroder, M. Gluckmann, M. Beyer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 2697–2705.
- [57] J. K. Diedrich, R. R. Julian, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12212–12213.
- [58] R. Antoine, L. Joly, T. Tabarin, M. Broyer, P. Dugourd, J. Lemoine, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 265–268.
- [59] Q. Sun, H. Nelson, T. Ly, B. M. Stoltz, R. R. Julian, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 958–966.