

Abzählen von chemisch unterschiedlichen labilen Wasserstoffatomen über Wasserstoff-Deuterium-Austausch in einer ESI-Quelle**

Sebastian Tittebrandt, Marina Edelson-Averbukh, Bernhard Spengler und Wolf D. Lehmann*

Organische Moleküle mit Heteroatom-gebundenen Wasserstoffatomen tauschen diese spontan gegen Deuterium, wenn sie in Kontakt mit D₂O, ND₃, D₂S, CH₃OD, CH₃COOD oder ähnlichen Substanzen kommen. Beim Wasserstoff-Deuterium-Austausch (HDX) unterscheidet man zwischen statischen und dynamischen Konzepten. Bei statischen HDX-Experimenten werden in Lösung alle labilen Wasserstoffatome ausgetauscht. Dies erleichtert z.B. die De-novo-Sequenzierung von Peptiden^[1] oder die Identifizierung von Medikamenten-Metaboliten.^[2] Dynamische HDX-Konzepte hingegen nutzen die Austauschkonstanten in Lösung, welche von der chemischen Bindung, der Temperatur und dem pH-Wert abhängen. Für Proteine wurden H-D-Austauschgeschwindigkeiten mit NMR-Spektroskopie bestimmt wobei Amid-Wasserstoffatome die größten Lebenszeiten zeigten.^[3] Diese können sich durch Wasserstoffsbrücken auf Stunden oder Tage verlängern.^[4] Proteinstrukturen, deren Dynamiken sowie Protein-Protein-Wechselwirkungen können über individuelle Austauschgeschwindigkeiten von Amid-Wasserstoffatomen untersucht werden.^[5] Der H-D-Austausch in der Gasphase hängt dagegen stark vom Unterschied in den Gasphasenbasizitäten der Reaktionspartner sowie von der Molekülstruktur ab. Dieser Austausch wird typischerweise in Ionenfallen-, Ionenmobilitäts- oder FTICR-Massenspektrometern durchgeführt.^[6] Sterische Faktoren können den H-D-Austausch in der Gasphase über einen „Relay“-Mechanismus stark beschleunigen,^[7] sodass chemisch identische Wasserstoffatome in der Gasphase ein stark unterschiedliches Austauschverhalten zeigen können.^[8] Eine typische Anwendung des H-D-Austauschs in der Gasphase ist die Analyse von Proteinstrukturen mit Elektrosprayionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS).^[9] Der H-D-Austausch in einer ESI-Ionenquelle, der simultan mit dem Ionisierungsprozess abläuft, ist eine spezielle Technik, die ausschließlich im Zeitfenster des ESI-Prozesses abläuft. Normalerweise bleiben Stöße zwischen ESI-Tröpfchen und Wassermolekülen der Luft unbe-

merkt, da diese nur zu einem H-H-Austausch führen. Wird hingegen ein Analyt aus Wasser in eine D₂O-haltige Atmosphäre gesprührt, so wird der Austauschprozess durch Deuteriumeinbau sichtbar.^[10] Entsprechend wird bei inverser Isotopenzusammensetzung von Lösungsmittel und Atmosphäre ein Verlust von Deuterium beobachtet.^[11] Deuteriumverlust aus labilen Wasserstoffpositionen ist ein generelles Problem bei ESI-MS von Analyten mit solcher Markierung.^[12]

In unserer Studie haben wir erstmals ESI-HDX-Prozesse detailliert untersucht, weil wir denken, dass deren Verständnis die analytischen Möglichkeiten der ESI-MS erweitern kann. Als Modellsysteme wählten wir kleine Moleküle, Aminosäuren und modifizierte Aminosäuren, da diese Substanzklassen eine breite strukturelle und chemische Variabilität ihrer labilen Wasserstoffatome zeigen. Als Techniken haben wir nanoESI mit einer offenen und ESI mit einer geschlossenen Ionenquelle benutzt. Experimentelle Details finden sich in den Hintergrundinformationen. Zunächst wurden die Standard-Aminosäuren mit nanoESI-HDX analysiert wobei ein effizienter H-D-Austausch an Carboxyl-OH-Gruppen sowie aliphatischen und aromatischen OH-Gruppen beobachtet wurde.

Das heißt, dass neutrale und basische Aminosäuren, wie Asn, Gln und Cys, nur ein H-Atom austauschen, wohingegen Ser, Thr, Asp und Glu zwei H-Atome austauschen. Die einzige Ausnahme in dieser Gruppe ist Histidin, das vier H-Atome austauscht (Abbildung S17). Anschließend wurden die Standard-Aminosäuren mit ESI-HDX analysiert. HDX- und DHX-Experimente zeigen gespiegelte Resultate bezüglich ihres Austauschverhaltens (Abbildung 1). Der Durch-

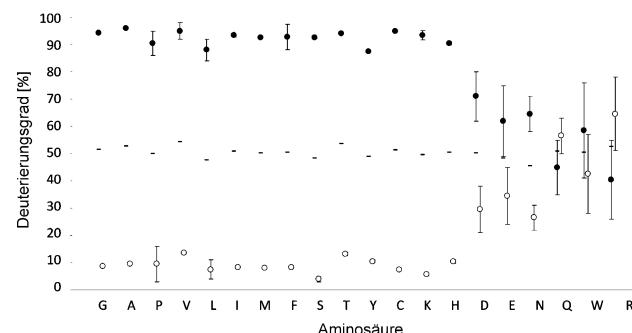


Abbildung 1. ESI-HDX- und DHX-Experimente für die 20 Standard-Aminosäuren. Der Deuterierungsgrad ist normiert auf die Gesamtzahl der austauschbaren Wasserstoffatome in der jeweiligen Aminosäure. (Schwarze Kreise: ESI-HDX; offene Kreise: ESI-DHX; Fehlerbalken = ± 1 Standardabweichung; Striche zeigen den Durchschnitt der jeweiligen HDX- und DHX-Experimente für $n=3$.)

[*] S. Tittebrandt, Dr. M. Edelson-Averbukh,^[+] Prof. Dr. W. D. Lehmann
Molekulare Strukturanalyse, Deutsches Krebsforschungszentrum
69120 Heidelberg (Deutschland)
E-Mail: wolf.lehmann@dkfz.de

Prof. Dr. B. Spengler^[+]
Institut für Anorganische und Analytische Chemie
Universität Gießen, 35392 Gießen (Deutschland)

[+] Aktuelle Adresse: Department of Chemistry, Imperial College
London SW7 2AZ (Großbritannien)

[**] Wir danken für die Unterstützung dieser Arbeiten durch das Land
Hessen im Rahmen des LOEWE-Schwerpunkts „AmphiProbe“.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201304249> zu finden.

schnitt von Deuteriumeinbau und -verlust liegt etwa bei 50 %, sodass hier kein Isotopieeffekt beobachtet wurde. Generell war ESI-HDX effektiver als nanoESI-HDX, da mit der zuerst genannten Technik SH-, α -NH- und ϵ -NH-Atome zusätzlich ausgetauscht wurden. Annähernd vollständiger Austausch (>90 %) wurde bei 14 von 20 Aminosäuren beobachtet. Die rechts im Diagramm gruppierten sechs Aminosäuren zeigen sowohl einen weniger effektiven Austausch als auch eine größere Variabilität. In Abbildung 2 wird dieses Phänomen

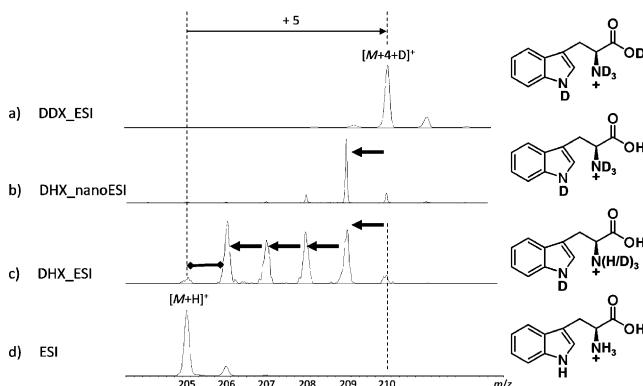


Abbildung 2. Differenzierung von drei Klassen an austauschbaren Wasserstoffatomen am Beispiel von Tryptophan: a) vollständiger HDX mit D_2O als Lösungsmittel und D_2O gesättigtem N_2 -Gas in der Ionenquelle; b) partieller DHX von Carboxyl-OH mit nanoESI, D_2O als Lösungsmittel und offener Ionenquelle; c) partieller DHX von Carboxyl-OH und den Wasserstoffatomen der α -Aminogruppe mit ESI, D_2O als Lösungsmittel und H_2O -gesättigtem Stickstoff in der Ionenquelle; d) ESI-MS von Tryptophan.

beispielhaft an Tryptophan erläutert. Die niedrigere Austauscheffizienz kann H-Atome an der Amid-, Indol- und Guanidino-Gruppe zugeschrieben werden. Deutlich wird dies an der Lücke im Isotopenmuster zwischen dem Signal mit der niedrigsten Zahl an Deuteronen und dem monoisotopischen Peak. Die erhöhte Variabilität bei den Aminosäuren Asp, Glu, Asn, Gln und Trp korreliert mit der α -Aminogruppe, welche ein Austauschmuster zeigt, in dem alle Isotopologen der NH_3^+ -Gruppe sichtbar sind, woraus auf die Präsenz von drei chemisch identischen Wasserstoffatomen geschlossen werden kann (siehe Abbildung 2c und die Hintergrundinformationen).

Kombinierte nanoESI- und ESI-HDX/DHX-Messungen (Abbildung 1) wurden für die 20 Standard-Aminosäuren, einige modifizierte Aminosäuren sowie andere kleine Moleküle durchgeführt. Labile Wasserstoffatome können eingestuft werden als 1) effizient austauschend, 2) moderat austauschend und 3) nicht austauschend (Tabelle 1). Obige Beobachtungen können gut mit Austauschkonstanten von entsprechenden Wasserstoffatomen in Proteinen erklärt werden, wie sie mit NMR-Spektroskopie in Lösung bestimmt wurden.^[3] Dieser Vergleich zeigt, dass Klasse-1-Wasserstoffatome, die nur bei nanoESI-HDX austauschen, kurze Lebenszeiten im Submillisekunden-Bereich haben. Klasse-2-Wasserstoffatome, die zusätzlich mit ESI-HDX austauschen, haben Lebenszeiten von 1 bis 10 Millisekunden. Klasse-3-

Tabelle 1: Einteilung labiler Wasserstoffatome anhand ihres Austauschverhaltens in nanoESI-HDX- und ESI-HDX-Experimenten.

Klasse 1: austauschbar durch nanoESI-HDX	Klasse 2: zusätzlich austauschbar durch ESI-HDX	Klasse 3: weder durch ESI-HDX noch durch nanoESI-HDX austauschbar
Carboxyl-OH aliphatisches OH aromatics OH Phosphoryl-OH	α -Amino-NH andere Amino-NH Sulphydryl-SH	Amid-NH Indol-NH Guanidino-NH

Wasserstoffatome, die weder mit nanoESI-HDX noch mit ESI-HDX ausgetauscht werden können, haben Lebenszeiten länger als 50 ms. Die mittleren Lebenszeiten der chemischen Wasserstoffspezies korrelieren demnach gut mit den Lebenszeiten der Elektrospray-Tröpfchen. NanoESI-Tröpfchen (Durchmesser < 200 nm) haben eine Lebenszeit < 1 Millisekunde, wohingegen die deutlich größeren ESI-Tröpfchen (Durchmesser 1–10 μm) eine Lebenszeit von mehreren Millisekunden haben.^[13] Die Lebenszeiten von ESI-Tröpfchen und von unterschiedlichen Spezies von labilen Wasserstoffatomen sind in Abbildung 3 gegenübergestellt. Diese Zu-

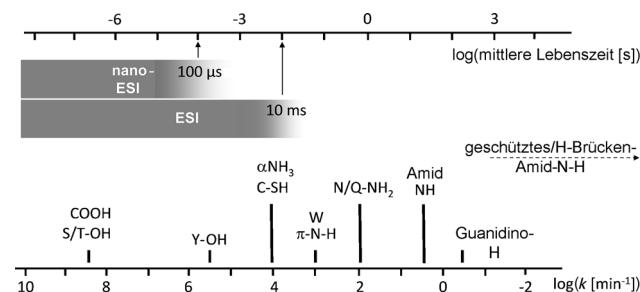


Abbildung 3. Zeitskala der Austauschgeschwindigkeiten in Lösung von unterschiedlichen Spezies an labilen Wasserstoffatomen, deren mittlere Lebenszeiten sowie die Lebenszeiten von nanoESI- und ESI-Tröpfchen.

sammenstellung zeigt, dass das H-D-Austauschverhalten bei ESI mit der Kinetik des H-D-Austausches in Lösung erklärt werden kann. Zur Unterstützung dieser Argumentation sind die Wasserstoffatome an den Rändern der typischen Lebensdauer von nanoESI- und ESI-Tröpfchen von besonderer Bedeutung. So sind z.B. mit nano-ESI-HDX Tyr-OH-Wasserstoffatome austauschbar, wohingegen die Cys-SH- und α -NH $_3^+$ -Wasserstoffatome unter diesen Bedingungen stabil sind.

Wie aus Abbildung 3 deutlich wird, ist die mittlere Lebenszeit von Tyr-OH-Wasserstoffatomen innerhalb der nanoESI-Tröpfchenlebenszeit, wohingegen die mittleren Lebenszeiten der Cys-SH- und α -NH $_3^+$ -Wasserstoffatome außerhalb dieses Zeitfensters liegen. Der gleiche Zusammenhang zwischen Tröpfchenlebenszeit und Austauschverhalten kann auch für den H-D-Austausch bei ESI beobachtet werden: Die Cys-SH- und α -NH $_3^+$ -Wasserstoffatome haben Lebenszeiten innerhalb der ESI-Tröpfchenlebenszeit, wohingegen die anderen, nicht austauschbaren Wasserstoffato-

me längere Lebenszeiten aufweisen. Der partielle H-D-Austausch der NH₃-Gruppe der sechs Aminosäuren im rechten Teil von Abbildung 1 ist wahrscheinlich durch eine erhöhte Lebenszeit dieser Gruppe hervorgerufen, was wiederum für intramolekulare Wechselwirkungen mit ihren polaren Seitenketten spricht. Unsere Erklärung dieses Austauschverhaltens legt den Schluss nahe, dass es sich bei ESI-HDX um einen kinetisch kontrollierten Prozess in Lösung handelt und nicht, oder nur zum kleineren Teil, um einen Prozess in der Gasphase. Dies bedeutet, dass während des ESI-Prozesses neben der Lösungsmittel-Verdampfung auch die Rekondensation eine wichtige Rolle spielt. Die Rekondensation führt dazu, dass Ionen-emittierende ESI-Tröpfchen oder zumindest deren Oberfläche bereits weitgehend die Wasserstoff-Isotopenzusammensetzung der Atmosphäre angenommen haben. Die auf den ESI-Tröpfchen konzentrierten Überschussladdungen sind teilweise desolvatisiert und fördern somit die Rekondensation, um in den solvatisierten Zustand zurückzukehren.^[14]

So wurde z.B. eine Steigerung der ESI-Signalintensität nach Einbringen kleiner Mengen Wasserdampf in eine ESI-Quelle beobachtet und mit Rekondensation erklärt.^[15] Unsere Daten von nanoESI- und ESI-HDX können nach der chemischen Spezies ihrer labilen Wasserstoffatome geordnet werden. Dies belegt zusätzlich, dass der H-D-Austausch in Lösung der bestimmende Prozess ist. Bei Vorherrschen eines Gasphasenaustauschs wäre eine konsistente Klassifizierung basierend auf chemischen Eigenschaften der Wasserstoffatome aufgrund des starken Einflusses der Moleküllstruktur nicht zu erwarten. So ist z.B. das H-D-Austauschverhalten von Lysin und Ornithin in der Gasphase stark unterschiedlich,^[16] während sich diese Homologe bei ESI-HDX sehr ähnlich verhalten.

Die kombinierte Nutzung von nanoESI- und ESI-HDX erweitert die analytischen Möglichkeiten von ESI-MS dahingehend, dass 3 Klassen von labilen Wasserstoffatomen unterschieden werden können, je nachdem, ob ihre mittleren Lebenszeiten in den Bereichen < 1 ms, 1–10 ms oder darüber liegen. Da es sich hier offenbar um einen Austauschprozess in Lösung handelt, ist eine Vorhersage aufgrund der Bindungsart möglich. Damit können die Klasse des austauschbaren Wasserstoffatoms und häufig auch die Position des Ladungsprotons bestimmt werden. Die unerwartete Beobachtung, dass es sich bei ESI-HDX um einen kinetisch kontrollierten Prozess handelt, eröffnet die Möglichkeit, damit schnelle H-D-Austauschprozesse zu untersuchen. Die kombinierte Nutzung von nanoESI-HDX und ESI-HDX stellt dadurch auch ein interessantes neues Verfahren zum Studium des Elektrospray-Ionisierungsprozess dar.

Eingegangen am 17. Mai 2013
Online veröffentlicht am 11. Juli 2013

Stichwörter: Elektrosprayionisation · Labile Wasserstoffatome · Tröpfchenlebensdauer · Wasserstoff-Deuterium-Austausch

- [1] a) N. F. Sepetov, O. L. Issakova, M. Lebl, K. Swiderek, D. C. Stahl, T. D. Lee, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, *7*, 58–62; b) B. Spengler, F. Lützenkirchen, R. Kaufmann, *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *28*, 1482–1490.
- [2] a) D. Q. Liu, C. E. C. A. Hop, M. G. Beconi, A. Mao, S. H. L. Chiu, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 1832–1839; b) M. Wind, K. Gebhardt, H. Grunwald, J. Spickermann, M. Donzelli, L. Kellenberger, M. Müller, P. Fullhardt, A. Schmidt-Hoffmann, M. Schleimer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 1093–1099.
- [3] K. Wüthrich, G. Wagner, *J. Mol. Biol.* **1979**, *130*, 1–18.
- [4] a) V. Katta, B. T. Chait, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6317–6321; b) Z. Q. Zhang, W. Q. Li, T. M. Logan, M. Li, A. G. Marshall, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 2203–2217.
- [5] a) A. N. Hoofnagle, K. A. Resing, N. G. Ahn, *Annu. Rev. Biophys. Biomol.* **2003**, *32*, 1–25; b) T. E. Wales, K. E. Fadgen, G. C. Gerhardt, J. R. Engen, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 6815–6820; c) M. J. Chalmers, S. A. Busby, B. D. Pascal, G. M. West, P. R. Griffin, *Expert Rev. Proteomics* **2011**, *8*, 43–59; d) M. P. Mayer, *Mol. Cell.* **2010**, *39*, 321–331; e) S. Amon, M. B. Trelle, O. N. Jensen, T. J. D. Jorgensen, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4467–4473.
- [6] M. K. Green, C. B. Lebrilla, *Mass Spectrom. Rev.* **1997**, *16*, 53–71.
- [7] T. Wyttenbach, M. T. Bowers, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 9–14.
- [8] a) J. E. Chipuk, J. S. Brodbelt, *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *267*, 98–108; b) J. Mo, K. Hakansson, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7893–7898.
- [9] K. D. Rand, S. D. Pringle, J. P. Murphy, K. E. Fadgen, J. Brown, J. R. Engen, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 10019–10028.
- [10] a) W. Lam, R. Ramanathan, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13*, 345–353; b) Z. Takats, S. C. Nanita, G. Schlosser, K. Vekey, R. G. Cooks, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6147–6154; c) Z. Takáts, G. Schlosser, K. Vekey, *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, *228*, 729–741; d) D. Q. Liu, C. E. C. A. Hop, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *37*, 1–18; e) J. C. Wolff, A. M. F. Laures, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 3769–3779.
- [11] V. Katta, B. T. Chait, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 214–217.
- [12] J. McCloskey, *Methods Enzymol.* **1990**, *193*, 329–338.
- [13] a) M. Wilm, M. Mann, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **1993**, *136*, 167–180; b) M. Wilm, M. Mann, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1–8; c) A. P. Bruins, *J. Chromatogr. A* **1998**, *794*, 345–357.
- [14] L. Konermann, E. Ahadi, A. D. Rodriguez, S. Vahidi, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 2–9.
- [15] S. Nguyen, J. B. Fenn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 1111–1117.
- [16] J. V. Arrington, R. N. Straus, P. F. Reynolds, J. L. Poutsma, E. M. Marzluff, J. C. Poutsma, *Int. J. Mass Spectrom.* **2012**, *330*, 200–206.