



Die Erhaltung nativer Proteinstrukturen unter Ausschluss von Lösungsmittel: eine Untersuchung mit Hilfe der Kombination von Ionenmobilität mit Spektroskopie

Jongcheol Seo, Waldemar Hoffmann, Stephan Warnke, Michael T. Bowers, Kevin Pagel und Gert von Helden*

Abstract: Kann die Struktur kleinerer bis mittelgroßer Proteine beim Übergang aus der Lösung in die Gasphase bewahrt werden? Zwar haben sich eine Vielzahl von Studien dieser Frage gewidmet, jedoch steht eine eindeutige Antwort noch aus. Die Klärung dieses Problems ist gleichwohl wichtig, denn davon hängt es ab, ob die empfindlichen Methoden der nativen Massenspektrometrie Probleme der Strukturbiologie adressieren können. Mithilfe einer Kombination aus Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie und Infrarotspektroskopie untersuchen wir sowohl Sekundär- als auch Tertiärstruktur von Proteinen, die unter milden Bedingungen aus der Lösung in die Gasphase gebracht werden. In dieser Studie wurden die Moleküle Myoglobin und β -Lactoglobulin untersucht, die prototypische Beispiele für helikale bzw. β -Faltblatt-reiche Proteine sind. Unsere Ergebnisse zeigen, dass für niedrige Ladungszustände und unter sanften Bedingungen Aspekte der nativen Sekundär- und Tertiärstruktur bewahrt werden können.

Aufgrund ihrer Genauigkeit, Empfindlichkeit und Schnelligkeit ist die Massenspektrometrie (MS) in Kombination mit Fragmentationstechniken die Methode der Wahl, um Primärstrukturen von Peptiden und Proteinen zu entschlüsseln.^[1] Um jedoch Informationen über deren Faltung zu erhalten, werden für gewöhnlich Spektroskopie- oder Streuungsexperimente in der kondensierten Phase durchgeführt. Diese Techniken haben oftmals eine geringe Empfindlichkeit

und sind deshalb auf hohe Probenkonzentrationen angewiesen. Andererseits können sie aber auch eine Fülle an Informationen über Proteine unter physiologisch relevanten Bedingungen bereitstellen. Ob die native Proteinstruktur beim Übergang aus der Lösung in die Gasphase bewahrt werden kann, und wenn ja, für Proteine welcher Größe, bleibt jedoch eine offene Frage. Falls dies möglich ist, können sehr empfindliche Methoden der Massenspektrometrie eingesetzt werden, um Strukturinformationen zu gewinnen. Für sehr große Biomoleküle, wie Proteinkomplexe^[2] oder sogar ein vollständiges Virus,^[3] gibt es eindeutige Belege dafür, dass die native Struktur auch in Abwesenheit des Lösungsmittels erhalten bleibt. Für kleinere Proteine ist die Situation jedoch noch nicht klar, weshalb wir diesen Bereich hier untersuchen wollen.

Um die Faltung von isolierten Peptiden und Proteinen zu untersuchen, kann die Massenspektrometrie an zusätzliche Methoden gekoppelt werden. Beispiele hierfür sind Wasserstoff-Deuterium-Austausch(HDX)-Messungen,^[4] nichtthermische Fragmentationstechniken, die auf der Absorption von UV-Photonen oder dem Einfang von Elektronen beruhen,^[5] Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS)^[6] oder auch optische/IR-Spektroskopie.^[7] Die direktesten Informationen über die Faltung werden hierbei durch IMS und IR-Spektroskopie erhalten. In IMS wird der über alle Raumwinkel gemittelte Stoßquerschnitt mit hoher Genauigkeit gemessen. Mithilfe von theoretischen Molekülmodellen können diese Messungen dann Informationen über die Größe und Gestalt eines Moleküls liefern, weshalb IMS ausgiebig für Untersuchungen an Proteinen und Proteinaggregaten verwendet wird. Eine allgemeine Beobachtung dieser Studien ist, dass bei hoher Ladung des Moleküls, die intramolekulare Coulomb-Abstoßung zu helikalen Strukturen führt^[8] und letztlich, bei sehr hohen Ladungszuständen, eine gestreckte, lineare Struktur vorliegt.^[9] Bei niedrigen Ladungszuständen bleiben die Proteine jedoch kompakt und weisen eine Größe auf, wie sie für die jeweilige native Lösungsstruktur erwartet wird.^[8] Allerdings kann IMS keine direkten Informationen über die Sekundärstruktur eines Proteins liefern, und die Beobachtung einer kompakten Struktur ist kein Garant für die Erhaltung einer nativen Struktur. Andererseits ist die IR-Spektroskopie empfindlich auf die Sekundärstruktur, da das lokale Umfeld von charakteristischen Oszillationen, z.B. die C=O-Streck-(Amid-I) oder die N-H-Biegeschwingung (Amid-II), deren IR-Bandenpositionen beeinflusst. Aus diesem Grund wird die IR-Spektroskopie routinemäßig zur Untersuchung der Sekundärstruktur in der kondensierten Phase angewendet.^[10]

[*] Dr. J. Seo, W. Hoffmann, Dr. S. Warnke, Prof. Dr. K. Pagel, Dr. G. von Helden
Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft
Faradayweg 4–6, 14195 Berlin (Deutschland)
E-Mail: helden@fhi-berlin.mpg.de

Prof. Dr. M. T. Bowers
Department of Chemistry and Biochemistry
University of California Santa Barbara
Santa Barbara, CA 93106 (USA)

Prof. Dr. K. Pagel
Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin
Takustraße 3, 14195 Berlin (Deutschland)

Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201606029> zu finden.

© 2016 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial License, die eine Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird.

IR-Multiphotonenendissoziations(IRMPD)-Spektroskopie^[11] wurde bereits an einer Vielzahl von kleinen Peptiden oder Peptidkomplexen^[7b,c] in der Gasphase angewendet und mit quantenchemischen Berechnungen kombiniert, um detaillierte Strukturinformationen zu erhalten. Für sehr kleine Systeme, bestehend aus nur wenigen Aminosäuren, werden für gewöhnlich Gasphasenstrukturen beobachtet, die sich deutlich von den Strukturen der kondensierten Phase unterscheiden können. Wenn jedoch große Energiebarrieren beteiligt sind, wie sie beispielsweise bei der *cis-trans*-Isomerisierung von Prolin eine Rolle spielen, können Strukturelemente aus der Lösung erhalten bleiben.^[12] In jedem Fall sind diese Gasphasen-„Reinraum“-Strukturen außerordentlich nützlich, da sie sich zur Überprüfung von Theorien eignen und auch zum allgemeinen Verständnis von intrinsischen intramolekularen Wechselwirkungen in Biomolekülen beitragen.

Es gibt bisher nur wenige IR-spektroskopische Studien, die sich mit isolierten Proteinen in Abwesenheit eines Lösungsmittels befassen.^[9a,13] Im mittleren IR-Bereich können individuelle Oszillatoren von größeren Molekülen nicht spektral aufgelöst werden, sodass für z. B. Proteine sehr breite Amid-I- und Amid-II-Banden beobachtet werden, was auch in der kondensierten Phase der Fall ist.^[9a,13b-d] Die Bandenpositionen in diesen vorangegangenen Studien weisen hauptsächlich auf helikale Strukturen hin, wobei in diesen frühen Arbeiten relativ hohe Ladungszustände untersucht wurden,^[9a,13b-d] bei denen die Erhaltung nativer Lösungsstrukturen nicht zu erwarten ist.

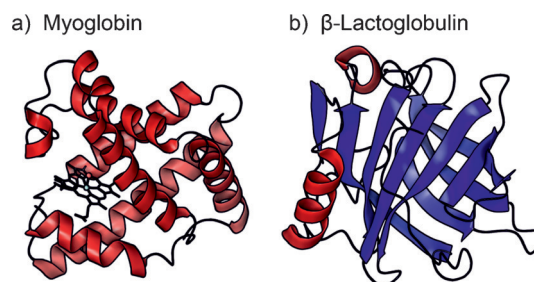


Abbildung 1. Die Strukturen in der kondensierten Phase von a) Myoglobin, einem 153 Aminosäuren langen Protein mit hauptsächlich α -helikaler nativer Sekundärstruktur und einer nichtkovalent gebundenen Häm-Gruppe (PDB-Code: 1MBN) und b) β -Lactoglobulin, einem 162 Aminosäuren langen Protein mit einem hohen Anteil an β -Faltblatt-Sekundärstrukturelementen (PDB-Code: 3BLG).

Hier verwenden wir einen Ansatz, in dem IMS präparativ zur Selektion bestimmter Größen/Formen von Proteinen genutzt wird, um anschließend mittels IR-Spektroskopie deren Sekundärstruktur zu untersuchen (siehe die Hintergrundinformationen für Details). Die Experimente wurden an den beiden Proteinen Myoglobin und β -Lactoglobulin durchgeführt. Myoglobin ist ein 153 Aminosäuren langes Protein, dessen native Sekundärstruktur weitestgehend ($\approx 85\%$) α -helikal ist, während β -Lactoglobulin aus 162 Aminosäuren besteht und einen signifikanten Anteil ($\approx 60\%$) an β -Faltblatt-Sekundärstrukturelementen aufweist. Die jeweiligen

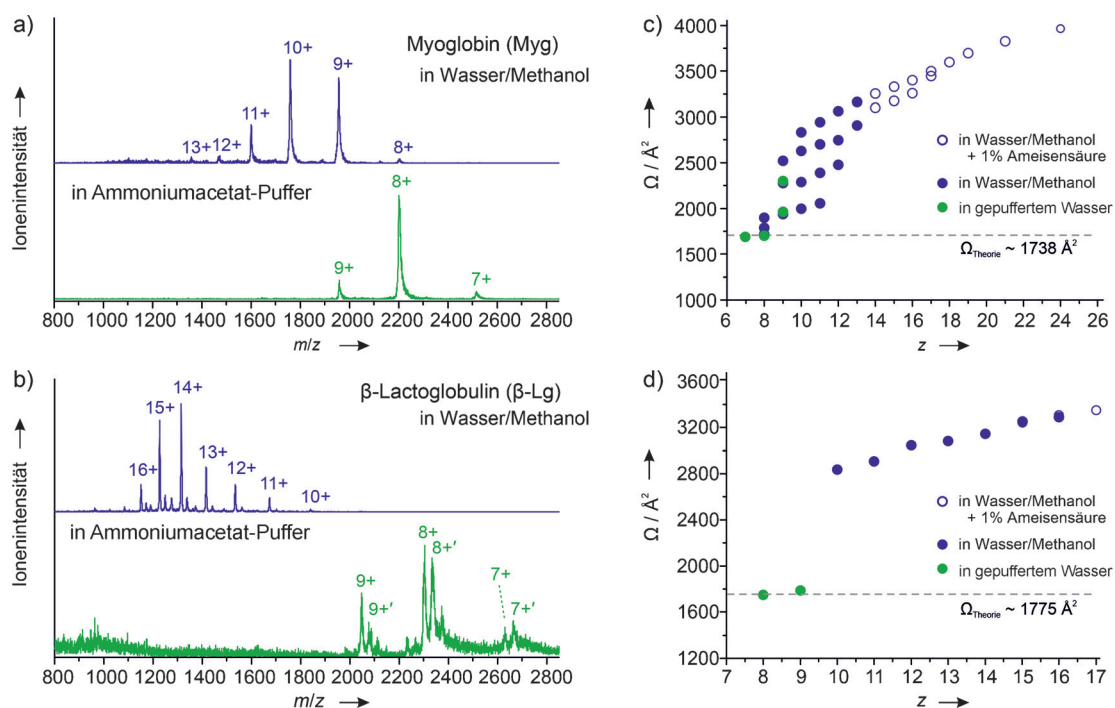


Abbildung 2. Massenspektren und Stoßquerschnitte für Myoglobin und β -Lactoglobulin. a,b) Massenspektren von Ionen aus gepufferten Lösungen (Ammoniumacetat, pH ≈ 7 , grün) und aus Wasser/Methanol (blau). Intensive Signale sind gekennzeichnet, und im Fall von Myoglobin entsprechen diese der Holo-Form. Für niedrige Ladungszustände von β -Lactoglobulin sind Signale zu sehen, die der nichtkovalenten Bindung von Palmitinsäure entsprechen (gekennzeichnet als 7+', 8+' und 9+'). c,d) Darstellung der Stoßquerschnitte als Funktion der Ladung. Volle grüne Kreise kennzeichnen Ionen aus gepufferten Lösungen, volle blaue Kreise Ionen aus Wasser/Methanol und leere blaue Kreise Ionen aus Wasser/Methanol mit 1% Ameisensäure.

Strukturen aus der kondensierten Phase beider Proteine sind in Abbildung 1 gezeigt.

Abbildungen 2a und 2b zeigen die Elektrosprayionisations(ESI)-Massenspektren von Myoglobin und β -Lactoglobulin aus verschiedenen Lösungsmitteln. Die jeweils unteren Spektren (grün) wurden aus wässrigen Lösungen erhalten, in denen Ammoniumacetat-Puffer in Konzentrationen von 10 mmol L^{-1} vorhanden war. Unter diesen Bedingungen beobachtet man in beiden Fällen eine schmale Ladungsverteilung mit Intensitätsmaxima beim Ladungszustand $8+$. Für β -Lactoglobulin werden zusätzliche Signale gefunden, die auf die nichtkovalente Bindung von Palmitinsäure zurückzuführen sind. Diese sind in Abbildung 2b als $9+$, $8+$ und $7+$ gekennzeichnet. Eine Änderung des Lösungsmittels zu Wasser/Methanol (1:1) führt zu den Massenspektren, die in blau dargestellt sind. Die Ladungsverteilungen sind breiter und verschieben sich zu höheren Ladungszuständen. Für Myoglobin wurden ausschließlich Signale in den Massenspektren beobachtet, die der Holo-Form zuzuordnen sind, in der das Häm gebunden ist. Die hier gezeigten Massenspektren sind in Einklang mit bereits publizierten.^[14]

Die mittels IMS gemessenen Stoßquerschnitte sind als Funktion der Ladung in Abbildung 2c und 2d dargestellt. Der Messfehler aller gezeigten Stoßquerschnitte ist kleiner als das jeweilige Symbol. Grüne Kreise entsprechen Ionen aus wässrigen, gepufferten Lösungen, während blaue Kreise für Ionen stehen, die aus Wasser/Methanol stammen. Im Fall von Myoglobin wurde für die meisten Ladungszustände eine Vielzahl von Konformeren mit unterschiedlichen Größen beobachtet, sodass pro Ladungszustand mehr als ein Stoßquerschnitt dargestellt ist. Theoretische Stoßquerschnitte, die für native Lösungsstrukturen erwartet werden, wurden mithilfe des EHSS-Algorithmus^[15] berechnet; die jeweiligen Werte sind als gestrichelte horizontale Linien in Abbildung 2c und 2d dargestellt.

Die Stoßquerschnitte beider Proteine zeigen, wie erwartet, eine positive Korrelation mit zunehmender Ladung. Für niedrige Ladungszustände werden kompakte Ionen beobachtet, die Stoßquerschnitte ähnlich der nativen Struktur aufweisen. Bei Zunahme der Ladung vergrößert sich auch der Stoßquerschnitt, was auf die Entfaltung des Proteins hinweist. Für Myoglobin koexistieren hierbei einige Konformere mit unterschiedlich ausgeprägter Entfaltung über viele Ladungszustände hinweg.^[16] β -Lactoglobulin zeigt ein anderes Verhalten. Für jeden Ladungszustand wird nur ein einziges Konformer beobachtet, und der Stoßquerschnitt wird sprunghaft größer, sobald das gepufferte Lösungsmittel gegen Wasser/Methanol ausgetauscht wird. Der niedrigste Ladungszustand aus Wasser/Methanol ist $10+$.

Um die Sekundärstruktur der Proteinionen zu untersuchen, wurden IR-spektroskopische Experimente mithilfe des IR-Freie-Elektronen-Lasers des Fritz-Haber-Instituts (FHI-FEL)^[17] durchgeführt. Abbildung 3 zeigt repräsentative Spektren im MIR-Wellenlängenbereich von sowohl Masse- zu Ladungs- als auch größenselektierten Ionen beider Proteine. In allen Spektren können Amid-I- und Amid-II-Banden beobachtet werden. Spektren von Ionen mit kleinem Stoßquerschnitt und niedrigem Ladungszustand sind in Abbildung 3c in grün dargestellt.

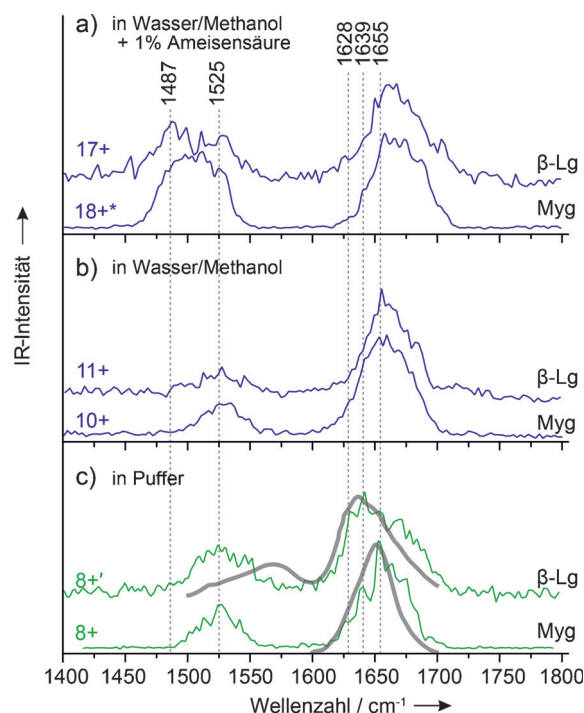


Abbildung 3. Infrarot(IR)-Spektren von Myoglobin und β -Lactoglobulin in der Gasphase und in der kondensierten Phase. a,b) Spektren von Ionen aus Wasser-Methanol-Lösungen. Lage und Form der Amid-I-Banden bei 1655 cm^{-1} deuten auf eine helikale Sekundärstruktur hin. c) Spektren von Proteinionen aus gepufferter Lösung (grün) und die jeweiligen FT-IR-Spektren aus der kondensierten Phase (grau; Daten für β -Lactoglobulin wurden aus Lit. [18] nachgebildet. Daten für Myoglobin aus Lit. [19]). Die Amid-I-Bande von Myoglobin $8+$ deutet auf eine helikale Sekundärstruktur hin, während für β -Lactoglobulin $8+$ ein klarer Anteil an Signalen zu erkennen ist, die auf β -Faltblatt-Sekundärstrukturen hinweisen.

Für die $8+$ -Ionen beider Proteine werden Amid-II-Banden bei ungefähr 1525 cm^{-1} gefunden – ein Wert, der auch typisch für Proteine in der kondensierten Phase ist.^[10] Die Amid-I-Bande für Myoglobin $8+$ ist weitestgehend symmetrisch und hat ein Maximum bei 1655 cm^{-1} , das typisch für helikale Sekundärstrukturen ist.^[10] Das IR-Spektrum von β -Lactoglobulin $8+$ unterscheidet sich von diesem deutlich. Die Amid-I-Bande ist unsymmetrisch mit einem Maximum um 1639 cm^{-1} , das einem Wert entspricht, der typisch für β -Faltblatt-Sekundärstrukturen ist.^[10]

Abbildung 3a und 3b zeigen die IR-Spektren der höheren Ladungszustände. Für Myoglobin im Ladungszustand $10+$ ist das Spektrum (Abbildung 3b) eines Konformers mit kleinem Stoßquerschnitt gezeigt (siehe auch Abbildung 2 für die Verteilung der Stoßquerschnitte). Es ist anzumerken, dass auch die anderen Konformere von Myoglobin innerhalb ein und desselben Ladungszustandes im Wesentlichen das gezeigte Spektrum reproduzieren (siehe Abbildung S3). Die Positionen der Amid-I- und Amid-II-Banden stimmen für die Ladungszustände $8+$ und $10+$ von Myoglobin annähernd überein, und lediglich eine leicht verbreiterte Amid-I-Bande ist für $10+$ zu beobachten. Für β -Lactoglobulin hingegen ändern sich vom Ladungszustand $8+$ ausgehend hin zu $11+$ sowohl Form als auch Position der Amid-I-Bande drastisch. Diese Änderung geht einher mit dem zuvor beobachteten

sprunghaften Anstieg des Stoßquerschnitts zwischen diesen beiden Ladungszuständen (Abbildung 2). Für das entfaltete und höher geladene 10+-Konformer wird eine Amid-I-Bande vorgefunden, die sowohl in ihrer Position als auch Form der Amid-I-Bande vom Myoglobin ähnelt und damit eine helikale Struktur für β -Lactoglobulin-11+-Ionen andeutet.

Wenn die Ladung weiter auf 17+ für β -Lactoglobulin und 18+ für Myoglobin erhöht wird, ändert sich die Form der Amid-I-Banden nicht, und nur eine geringfügige Blauverschiebung ist bemerkbar. Die Amid-II-Banden hingegen nehmen an relativer Intensität zu und eine Verschiebung hin zu kleineren Wellenzahlen ist zu beobachten. Dies lässt sich mit Hilfe einer früheren Studie interpretieren, in der solche Bandenverschiebungen anhand eines durch intramolekulare Coulomb-Abstoßung induzierten Übergangs von einer vornehmlich helikalen in eine vollständig gestreckte Sekundärstruktur erklärt wurden.^[9]

Durch Betrachtung der Spektren in Abbildung 3 wird deutlich, dass die Struktur von β -Lactoglobulin in der Gasphase im Ladungszustand 8+ primär aus β -Faltblättern bestehen muss. Dagegen weisen die Spektren aller untersuchter Myoglobin-Ionen auf hauptsächlich helikale Sekundärstrukturen hin. Diese Schlussfolgerungen bezüglich der Sekundärstruktur kompakter Proteinionen in der Gasphase sind in Einklang mit den nativen Strukturen beider Proteine in Lösung. Wenn hingegen die Ladung erhöht wird, zeigen beide Proteine eine helikale Struktur, wobei sich letztlich selbst diese bei sehr hohen Ladungszuständen in eine vollständig gestreckte Sekundärstruktur entwindet. Ein Vergleich zwischen Gasphasenspektren und Ergebnissen von Messungen in der kondensierten Phase ist nun von besonderem Interesse. Hierfür wurden Circular dichroismus (CD)-Spektren beider Proteine in den gleichen Lösungsmitteln aufgenommen, die für die spektroskopischen Experimente an isolierten Proteinen in der Gasphase verwendet wurden. Alle CD-Spektren für Myoglobin und das CD-Spektrum für β -Lactoglobulin in Wasser/Methanol zeigen Signaturen, die charakteristisch für helikale Strukturen sind (siehe Abbildung S2).^[20] Das CD-Spektrum von β -Lactoglobulin in gepufferter Lösung unterscheidet sich hingegen deutlich von den anderen und weist klar auf eine Struktur hin, die reich an β -Faltblättern ist.

Des Weiteren sind in Abbildung 3c die Gasphasen-IR-Spektren der kompakten Spezies (grün) mit den jeweiligen FT-IR-Spektren (grau) von Messungen an den Proteinen in der kondensierten Phase verglichen; diese wurden vorherigen Studien an β -Lactoglobulin^[18] und Myoglobin^[19] entnommen. Auch hier zeigt die FT-IR-Amid-I-Bande für β -Lactoglobulin eine Form, die typisch für β -Faltblatt-Strukturen ist. Die Amid-I-Bande im FT-IR-Spektrum von Myoglobin ist jedoch eher symmetrisch und bei einer Wellenzahl zu beobachten, die charakteristisch für helikale Strukturen ist. In beiden Fällen ist die Übereinstimmung in der Amid-I-Region zwischen den Spektren aus der kondensierten und der Gasphase bemerkenswert. Dies zeigt, dass zumindest ein großer Teil der nativen Struktur aus der kondensierten Phase beim Übergang in die Gasphase erhalten bleibt.

IR-Spektroskopie ist empfindlich auf die Sekundärstruktur und ist in der Lage zwischen Helices oder β -Faltblättern zu

unterscheiden. Sie kann jedoch keine direkte Information über die Tertiärstruktur liefern, in der die jeweiligen Sekundärstrukturelemente eingebettet sind. Aus diesem Grund ist die IR-Spektroskopie eine hervorragende Ergänzung zu IMS, die selbst unempfindlich für Strukturdetails wie die Sekundärstruktur ist und nur Informationen über Größe und Form eines Ions liefert. Die hier verwendete Kombination aus IR-Spektroskopie und IMS liefert ein klares Bild der strukturellen Entwicklung von isolierten Proteinen in Abhängigkeit ihrer Ladung. Bei niedrigen Ladungszuständen können native Strukturelemente erhalten bleiben. Wenn jedoch die intramolekulare Coulomb-Abstoßung ansteigt und geladene Seitenketten an das Rückgrat des Proteins koordinieren,^[21] wird die native Struktur destabilisiert, was sich folglich in einem Anstieg im IMS-Stoßquerschnitt widerspiegelt. Helikale native Strukturen bleiben in entfaltenen Spezies erhalten (gezeigt durch IR-Spektroskopie). Dies ist wiederum zu erwarten, da entfaltete helikale Strukturen einen Großteil ihrer Wasserstoffbrücken bewahren können, während der Abstand zwischen gleichen Ladungen wächst. Die Situation ist für Proteine, deren native Struktur reich an β -Faltblättern ist, grundlegend anders. Bei Anstieg der Gesamtladung kommt es zur Entfaltung einzelner β -Faltblatt-Stränge, sodass die Erhaltung dieser in einer Vielzahl gebrochener Wasserstoffbrücken resultieren würde. Aus diesem Grund durchlaufen auch solche Proteine, die anfänglich reich an β -Faltblättern sind, eine Umfaltung zu helikalen Strukturen. Bei sehr hohen Ladungszuständen kommt es aufgrund der Coulomb-Abstoßung in jedem Fall zum Entwinden dieser helikalen Strukturen, sodass letztlich gestreckte Konformationen vorliegen.^[9]

Zusammenfassend zeigen die hier präsentierten Daten, dass für β -Lactoglobulin und Myoglobin sowohl Sekundär- als auch Tertiärstruktur aus der kondensierten Phase nach dem Transfer in die Gasphase bewahrt werden kann. Auf Methoden der Massenspektrometrie basierende Gasphasenmethoden sind äußerst empfindlich, und wenn diese mit IMS kombiniert werden, kann zudem eine hohe Selektivität durch die Auswahl einzelner Ladungszustände, Konformationen oder auch Aggregationszustände erzielt werden. Eine weitere Untersuchung mittels IR-Spektroskopie ist im Anschluss möglich. Die so erreichbare Selektivität und Empfindlichkeit kann mit keiner Methode der kondensierten Phase erreicht werden. Beim Übergang der Proteine aus der kondensierten Phase in die Gasphase müssen jedoch Sorgfalt und Vorsicht walten, denn nur unter sanften Bedingungen können mögliche Umfaltungen und die damit verbundenen Strukturänderungen vermieden werden.

Danksagung

Wir bedanken uns bei den Mitarbeitern der FHI-FEL-Einrichtung, insbesondere aber bei S. Gewinner und W. Schöllkopf, für die fachkundige Betreuung. M.T.B. bedankt sich für die Förderung durch die National Science Foundation (USA)

unter dem Zuschuss CHE-1301032 und für die Unterstützung der Alexander von Humboldt-Stiftung.

Stichwörter: Gasphasenreaktionen · IR-Spektroskopie · Massenspektrometrie · Proteinfaltung · Proteinstrukturen

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 14173–14176
Angew. Chem. **2016**, *128*, 14380–14384

-
- [1] A. Pandey, M. Mann, *Nature* **2000**, *405*, 837–846.
- [2] a) A. J. R. Heck, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 927–933; b) B. T. Rutolo, C. V. Robinson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 402–408.
- [3] G. Siuzdak, B. Bothner, M. Yeager, C. Brugidou, C. M. Fauquet, K. Hoey, C. M. Chang, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 45–48.
- [4] J. R. Engen, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7870–7875.
- [5] H. B. Oh, B. Moon, *Mass Spectrom. Rev.* **2015**, *34*, 116–132.
- [6] a) T. Wytenbach, M. T. Bowers, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 511–533; b) B. C. Bohrer, S. I. Mererbloom, S. L. Koeniger, A. E. Hilderbrand, D. E. Clemmer, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, *1*, 293–327; c) F. Lanucara, S. W. Holman, C. J. Gray, C. E. Eyers, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 281–294.
- [7] a) J. P. Simons, *Mol. Phys.* **2009**, *107*, 2435–2458; b) N. C. Polfer, J. Oomens, *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28*, 468–494; c) N. C. Polfer, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2211–2221.
- [8] a) K. B. Shelimov, D. E. Clemmer, R. R. Hudgins, M. F. Jarrold, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2240–2248; b) T. Wytenbach, M. T. Bowers, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 12266–12275.
- [9] a) A. I. González Flórez, E. Mucha, D.-S. Ahn, S. Gewinner, W. Schöllkopf, K. Pagel, G. von Helden, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3295–3299; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 3356–3360; b) E. Segev, T. Wytenbach, M. T. Bowers, R. B. Gerber, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 3077.
- [10] M. Jackson, H. H. Mantsch, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *30*, 95–120.
- [11] J. Oomens, B. G. Sartakov, G. Meijer, G. von Helden, *Int. J. Mass Spectrom.* **2006**, *254*, 1–19.
- [12] a) N. A. Pierson, L. Chen, S. J. Valentine, D. H. Russell, D. E. Clemmer, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13810–13813; b) L. Shi, A. E. Holliday, H. Shi, F. Zhu, M. A. Ewing, D. H. Russell, D. E. Clemmer, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12702–12711.
- [13] a) H. Oh, K. Breuker, S. K. Sze, Y. Ge, B. K. Carpenter, F. W. McLafferty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15863–15868; b) J. Oomens, N. Polfer, D. T. Moore, L. van der Meer, A. G. Marshall, J. R. Eyler, G. Meijer, G. von Helden, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 1345–1348; c) Y. M. Fung, T. Besson, J. Lemaire, P. Maitre, R. A. Zubarev, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8340–8342; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8490–8492; d) K. Pagel, P. Kupser, F. Bierau, N. C. Polfer, J. D. Steill, J. Oomens, G. Meijer, B. Koks, G. von Helden, *Int. J. Mass Spectrom.* **2009**, *283*, 161–168.
- [14] a) L. Liu, E. N. Kitova, J. S. Klassen, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, *22*, 310–318; b) D. S. Gross, Y. Zhao, E. R. Williams, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, *8*, 519–524.
- [15] A. A. Shvartsburg, M. F. Jarrold, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *261*, 86–91.
- [16] a) K. B. Shelimov, M. F. Jarrold, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2987–2994; b) E. R. Schenk, R. Almeida, J. Miksovská, M. E. Ridgeway, M. A. Park, F. Fernandez-Lima, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2015**, *26*, 555–563.
- [17] W. Schöllkopf, S. Gewinner, H. Junkes, A. Paarmann, G. von Helden, H. Bluem, A. M. M. Todd, *Proc. SPIE* **2015**, *9512*, 95121L.
- [18] H. L. Casal, U. Köhler, H. H. Mantsch, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1988**, *957*, 11–20.
- [19] F. Meersman, L. Smeller, K. Heremans, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 2635–2644.
- [20] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, *BBA-Proteins Proteom.* **2005**, *1751*, 119–139.
- [21] S. Warnke, G. von Helden, K. Pagel, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1177–1180.

Eingegangen am 21. Juni 2016

Online veröffentlicht am 22. August 2016